



TITLE:

# 京都大学再生医科学研究所年報 2010

AUTHOR(S):

---

CITATION:

京都大学再生医科学研究所年報 2010. 京都大学再生医科学研究所年報  
2011, 13

ISSUE DATE:

2011-04-10

URL:

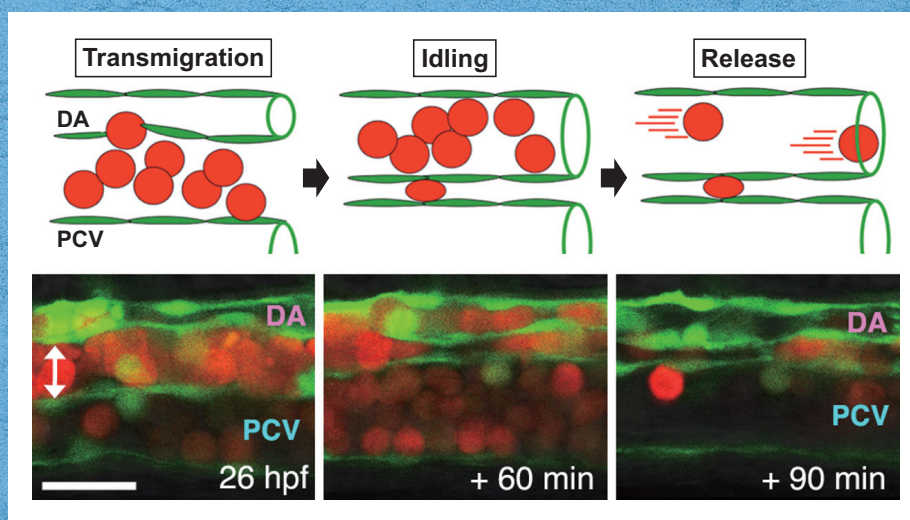
<http://hdl.handle.net/2433/145927>

RIGHT:



京都大学

## 再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences  
Kyoto University

〈第13巻〉

2010

平成22年



## 表紙写真

### 「血液循環開始の瞬間」

血管外で発生した赤血球が内皮細胞と相互作用しながら脈管内に侵入(Transmigration)し、接着を介した待機(Idling)状態を経て、プロテアーゼ依存的な接着解除(Release)の後に循環を開始する. DA=dorsal aorta, PCV=posterior cardinal vein, hpf=hours post-fertilization

## 目 次

1. 巻 頭 言 .....	1
2. 京都大学再生医科学研究所概要	
2-1 沿 革 .....	2
2-2 教員数等 .....	2
(1) 教 員 .....	2
(2) 大学院生・研修員・研究生等 .....	2
2-3 組 織 図 .....	3
3. 研究概要と研究業績	
生体機能学研究部門	
細胞機能調節学分野 (教 授 永田 和宏) .....	4
生体微細構造学分野 (講 師 平芳 一法) .....	9
生体機能調節学分野 (教 授 坂口 志文) .....	12
生体システム制御学分野 (教 授 長澤 丘司) .....	19
生体組織工学研究部門	
生体分子設計学分野 (教 授 開 祐司) .....	23
生体材料学分野 (教 授 田畑 泰彦) .....	30
組織修復材料学分野 (教 授 岩田 博夫) .....	50
生体物性学分野 (客員教授 鳥光 慶一) .....	58
再生統御学研究部門	
発生分化研究分野 (教 授 中辻 憲夫) .....	62
再生誘導研究分野 (教 授 山中 伸弥) .....	66
再生増殖制御学分野 (教 授 瀬原 淳子) .....	70
再生免疫学分野 (准教授 喜納 辰夫) .....	76
再生医学応用研究部門	
生体修復応用分野 (准教授 高橋 淳) .....	80
組織再生応用分野 (教 授 戸口田淳也) .....	85
器官形成応用分野 (准教授 角 昭一郎) .....	93
臓器再建応用分野 (准教授 中村 達雄) .....	98
附属再生実験動物施設 (准教授 近藤 玄) .....	105
附属幹細胞医学研究センター	
霊長類胚性幹細胞研究領域 (准教授 末盛 博文) .....	109
幹細胞分化制御研究領域 (准教授 山下 潤) .....	113
幹細胞加工研究領域 (准教授 多田 高) .....	122
細胞プロセッシング研究領域 (客員教授 高橋 恒夫) .....	126
再プログラム化研究領域 (客員教授 鳥居 隆三) .....	129
附属ナノ再生医工学研究センター	
ナノバイオプロセス研究領域 (教 授 楠見 明弘) .....	134
シミュレーション医工学研究領域 (准教授 玄 丞休) .....	139
ナノバイオメカニズム研究領域 (助 教 都賀谷紀宏) .....	149
バイオメカニクス研究領域 (教 授 安達 泰治) .....	151
再生医工学研究領域 (客員教授 Hwal SUH) .....	158
技 術 部 .....	160
4. ナノメディシン融合教育ユニット .....	161
5. 学 術 集 会 .....	162
6. 共 同 研 究 .....	170
7. 協議員・教職員・その他構成員名簿 .....	180





# 1. 巻 頭 言

再生医科学研究所は、平成 10 年に、「再生医学の学理の追求とその応用」を基本理念として設立されました。その特徴は、基礎生物学、医学、工学など異なる学術的背景を有する研究者により構成される総合研究所であることです。平成 20 年度には文部科学省から「全国共同利用・共同研究拠点」の認可を受け、「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」としても活動しています。拠点化とは、単なる大学附置研究所という位置付けから、個々の大学の枠を超えて研究者コミュニティに開かれた共同研究の場を提供し、この学問分野の発展推進に寄与することにあります。そのための具体的な活動については現在も模索中の面が少なからずあります。

この 10 年余の間に、再生医学、再生医療に対する社会的認知度が随分進んできました。しかしながら、我が国の経済状況に伴う限られた財政支援のなか、研究活動をどのような形に充実発展させ、再生医科学研究所の発展にも結び付けていくのか、今改めて考える時期にきています。経常研究の持続、深化、展開のみならず、新分野の開拓、萌芽的研究の推進、また研究の多様性の維持も重要です。研究成果の「出口」、医学生物学分野では「ヒトへの応用」を問われる昨今ですが、再生医科学研究所の基本理念が「再生医学の学理の追求とその応用」であり、重要な原理的基礎研究の成果が大きな応用研究に結び付くことも科学の歴史が教えるところです。どこに研究の立地点をとるにしろ、再生医学と再生医療の両方を意識して研究を展開できる環境を一層整えていきたいと思います。そのためには、「全国共同利用・共同研究拠点」としての活動を、再生医科学研究所の研究活動、とくに組織面の充実に如何に結び付けていくかが重要となってきます。客員部門の充実、拠点活動に必要な若手研究者のポストの獲得、公募共同研究を介した人材育成など、具体的方策を考えていく必要があります。

再生医科学研究所のさらなる発展に対して一層の御支援をお願い致します。

坂 口 志 文



## 2. 京都大学再生医科学研究所概要

### 2-1 沿革

本研究所は、平成10年4月9日に設置された。その前身である胸部疾患研究所は、昭和16年3月に「結核の予防及び治療」を主軸とする結核研究所として設置され、昭和42年6月には結核胸部疾患研究所に名称変更、さらに昭和63年4月には「胸部疾患に関する学理及びその応用の研究」を目的とした胸部疾患研究所への全面改組が行われたが、胸部疾患に関する研究・治療を取り巻く社会的要請の変化から、胸部疾患研究所は57年間にわたる使命を終え、平成10年度より、同研究所基礎系分野及び臨床系分野の一部を人工臓器の研究・開発に関して顕著な業績を挙げってきた生体医療工学研究センターと統合し、さらに実地臨床医学を行う医学研究科との協力により、「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的とする再生医科学研究所に改組・転換された。

改組・転換に伴い、胸部疾患研究所の臨床系分野の一部と研究所附属病院は、大学院医学研究科・医学部並びに医学部附属病院へとそれぞれ引き継がれた。

本研究所は、平成10年4月の発足時は5大研究部門と附属再生実験動物施設で組織された。その後、平成14年4月に附属幹細胞医学研究センターが設置され、平成16年4月に研究部門の再編(1大研究部門減)の実施によりナノ再生医工学研究センターが設置された。平成16年10月には、住友電気工業(株)の寄附による寄附研究部門が4年間の時限で設置された。現在4大研究部門(生体機能学、生体組織工学、再生統御学、再生医学応用)、3附属施設となっている。平成17年10月には、工学研究科、医学研究科とともに、ナノメディシン融合教育ユニットに参加した。

本研究所は、生命科学、医学、工学などの研究所が結集して再生医学の学際的基礎研究を推し進め、その成果の医学応用をめざすとともに、ヒトES細胞株の樹立機関として、樹立・特性解析を行ったES細胞を、全国の研究機関へ分配するナショナルバイオリソース事業を実施している。

また平成20年10月には共同利用・共同研究拠点の認定を文部科学大臣より受け、再生医学・再生医療に関する共同研究を実施している。

主な建物は、再生医科学研究所西館(旧胸部疾患研究所附属病院の後身である医学部附属病院南西病棟と合同使用)、再生医科学研究所東館(旧生体医療工学研究センター)、ES細胞研究棟(平成14年施工)、南部総合研究実験棟(ウイルス研、医学研究科との3部局合同使用)(平成14年施工)の4棟となっている。

### 2-2 教員数等

#### (1) 教 員 (平成23年1月1日現在)

現 員	教 授	准教授	講 師	助 教	小 計	特任講師	特任助教	合 計
	10(2)	12(1)	2	7	31(3)	1	4	36(3)

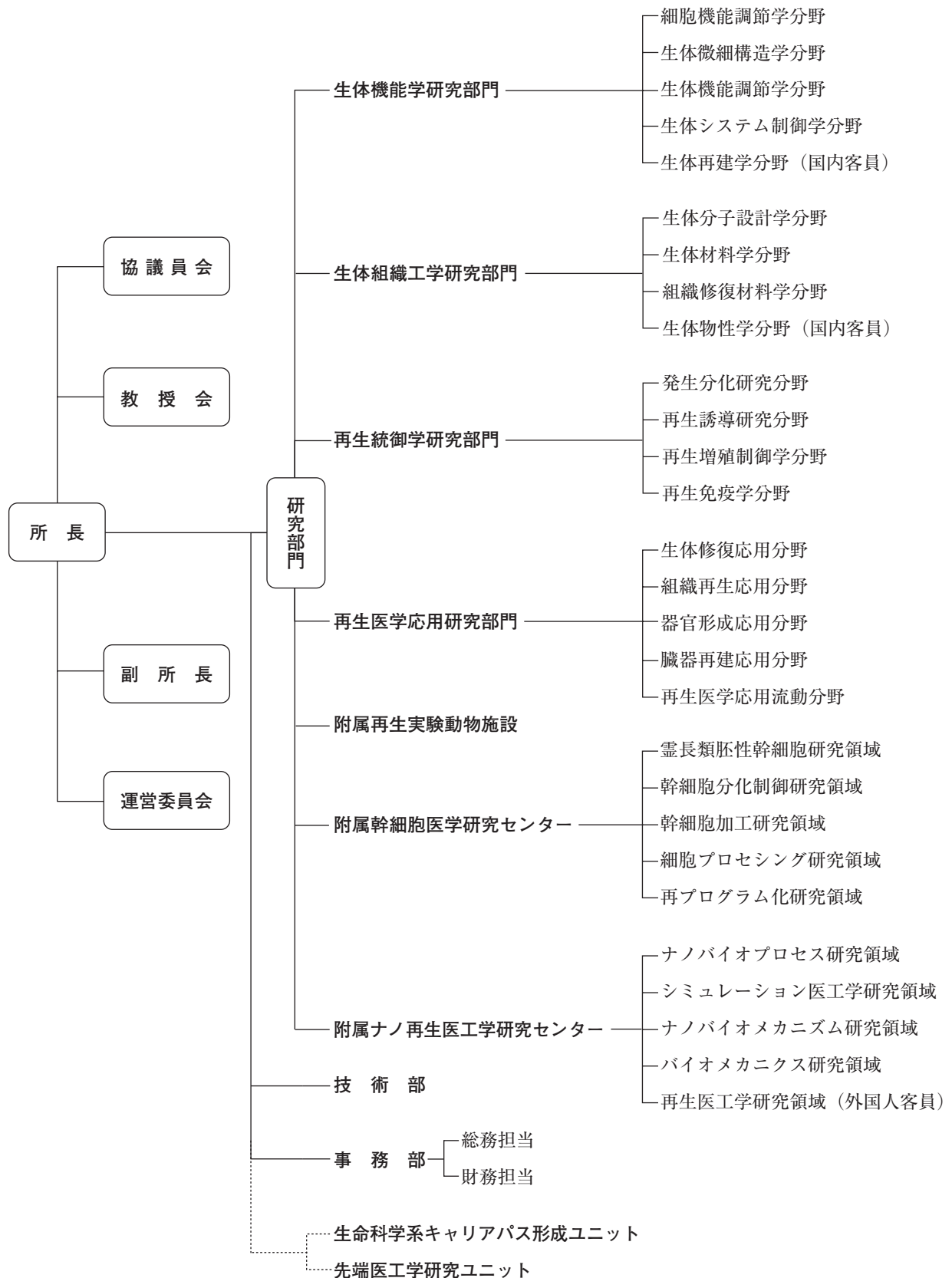
( ) 内は客員で外数

#### (2) 大学院生・研修員・研究生等 (平成23年1月1日現在)

大 学 院 生	研 修 員	研 究 生	外国人共同研究者等
100	6	8	5

## 2-3 組織図

(平成 23 年 1 月 1 日現在)





### 3. 研究概要と研究業績

#### 生体機能学研究部門

##### 細胞機能調節学分野

##### Department of Molecular and Cellular Biology

分野主任 教授 永田 和宏

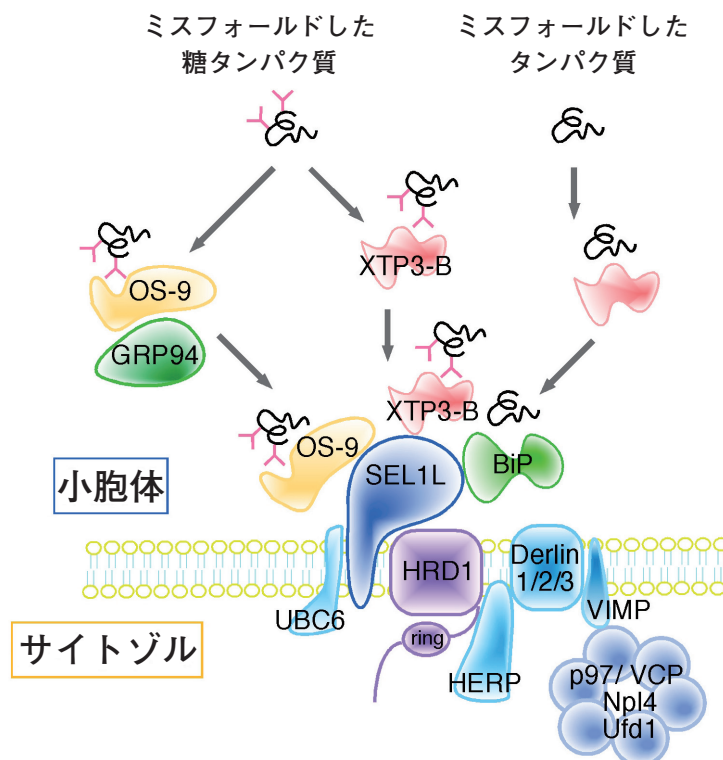
*Prof. Kazuhiro Nagata*

#### 【研究概要】

細胞機能調節学分野では、分子シャペロンの機能解析を中心に、再生現象の分子基盤とも言うべきタンパク質の合成・再生・品質管理の機構について、研究を進めた。

小胞体における productive folding に関する研究については、コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能解析を中心に研究を進めた。HSP47 はコラーゲンの正常な合成・分泌にとって必須の分子シャペロンであることを明らかにしてきたが、HSP47 は組織の繊維化にとっても重要な寄与をし、HSP47 の発現を抑制することによって繊維化の進行を遅らせることができる。HSP47 ノックアウトマウス、および HSP47 ノックアウト ES 細胞や繊維芽細胞を用いた研究より、HSP47 が I 型及び IV 型コラーゲンの分子成熟(3 本鎖形成)に必須の分子シャペロンであることを明らかにし、基底膜やコラーゲン繊維の形成に必須であることを明らかにした。また HSP47 ノックアウト細胞においては未熟なコラーゲンが小胞体に凝集体として蓄積するが、これらのコラーゲンはオートファジーによって分解を受けることを明らかにした。コラーゲン遺伝子は正常でもその高次構造形成に必須の分子シャペロン欠損によって起こる異常コラーゲンの分解を示した訳だが、さらにコラーゲン遺伝子の突然変異による病態においても、凝集体を作るコラーゲンはオートファジーで分解されることも示すことができた。従来コラーゲンの遺伝病として知られる骨形成不全症における変異コラーゲンは小胞体関連分解によって分解されると考えられていたが、凝集をつくるような変異コラーゲンはオートファジー分解を受けることを示したもので、コラーゲン関連疾患の治療戦略を考える上でも重要な発見である。最近ではコンディショナルノックアウト(cKO)を行うために、LoxP-Hsp47 を導入したマウスに、II 型コラーゲンのプロモーター下に Cre 遺伝子を発現するマウスを掛け合わせ、軟骨特異的に Hsp47 をノックアウトすることに成功した。このマウスでは II 型コラーゲンの分子成熟が阻害され、軟骨形成、および骨形成に顕著な異常が観察された。同様な手法を用い、Hsp47 の cKO による繊維化疾患モデルマウスの作製及びその解析も行っている。(文責・永田)

細胞内で生合成されたタンパク質は、正しい高次構造を取ってはじめて機能することができる。タンパク質が正しい高次構造を形成するためには、分子シャペロンタンパク質の介助が必要であること、また生合成の過程でしばしばタンパク質は高次構造形成に失敗する事が明らかになってきた。ミスフォールドしたタンパク質は、再度フォールディング・サイクルに入るか、場合によっては細胞内分解される必要がある。このように、正しい高次構造をもつ



#### 小胞体膜上に存在する品質管理複合体

小胞体では多くのタンパク質が生合成されるが、高次構造形成に失敗した不良品タンパク質は、小胞体からサイトゾルに引き出された後に、ユビキチン-プロテアソーム系で細胞内分解される。小胞体膜には、ユビキチンリガーゼ複合体 HRD1-SEL1L を中心に、大きな品質管理複合体が形成されている。小胞体内腔側には、分子シャペロンタンパク質やレクチンが結合し、細胞質側には AAA ATPase である p97/VCP が会合する。

タンパク質を生合成・再生し、ミスフォールドしたタンパク質を処理するメカニズムは、タンパク質の品質管理機構と呼ばれている。小胞体では、多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の生合成が行われており、これらのタンパク質の高次構造形成は小胞体品質管理機構 (ERQC: endoplasmic reticulum quality control) によって担われている。小胞体内でミスフォールドしたタンパク質はサイトゾルへ引き出された後、ユビキチン-プロテアソーム系で分解され、小胞体関連分解 (ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation) と呼ばれている。私たちは、ERQC および ERAD の作用機序の解明を、細胞、分子ならびに個体レベルで行っている。このメカニズムは、遺伝子レベルで変異をもったタンパク質が ERAD 機構によって分解されたり、あるいは ERQC の破綻が糖尿病や神経変性疾患などさまざまな疾患を引き起こすことが明らかにされ、病態解明や疾病治療の面からも注目されている。また、小胞体で生合成されるタンパク質の多くは N 結合型糖鎖をもった糖タンパク質であり、従って小胞体品質管理においては、糖鎖のトリミングと、特定の構造をもった糖鎖を認識するレクチンが、タンパク質のフォールディングや分解を制御することが知られている。私たちは、哺乳類小胞体に存在する分子シャペロンタンパク質やレクチン、酵素、小胞体膜上に存在するユビキチンリガーゼ複合体などのタンパク質品質管理に関わる分子を中心に研究を進めている。特に、小胞体関連分解を促進する EDEM タンパク質 (endoplasmic reticulum degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein) や、新規 ERAD レクチン OS-9 と XTP3-B、HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体の機能解析を行い、ERAD における糖鎖構造とこれを認識するレクチンの同定、小胞体膜上の品質管理複合体の解析と分解基質の受け渡しに関して、新しい知見を得ている。(文責 細川)

小胞体レドックス関連因子によるタンパク質の品質管理機構について研究を進めた。ジスルフィド還元酵素 ERdj



5 はミスフォールドタンパク質の分子間ジスルフィド結合を還元することでこれらの凝集体形成を抑制し、小胞体関連分解(ERAD)を促進する。ERdj5 が C 末端の thioredoxin 様ドメインで EDEM と結合して、ミスフォールドタンパク質を受け取り、これらのドメインで基質を還元し、N 末端に位置する J ドメインを介して基質を BiP に受け渡し、最終的に BiP を介して小胞体膜上にある ERAD 複合体に基質を受け渡すことを明らかにした。これにより ERdj5 による ERAD 促進機構の詳細な分子機構が明らかとなった。また、非糖タンパク基質では ERdj5 が BiP から基質を受け取ることができることがわかった。ERdj5 はこのように基質リクルート経路を 2 つ持つことで広範な基質の ERAD を促進することが明らかとなった。また、小胞体に約 20 種類存在するレドックス関連因子間のカスケードを明らかにするため、それぞれの因子が相互作用するパートナーを質量分析により網羅的に同定してきた。その結果に基づき、既に小胞体における酸化酵素 Ero1L と PDI が複合体を形成することで他のレドックス因子を効率良く酸化できることを明らかにしている。さらに、これらの質量分析の結果に基づき、小胞体における新たな PDI 酸化酵素として同定され、注目を浴びている Prx4 が ERp44 及び PDI と相互作用することで小胞体に局在するメカニズムを明らかにした。(文責・寶関)

The major focus in the Department of Molecular and Cellular Biology is to study the stress response and the regulation and function of molecular chaperone/stress proteins.

We found and cloned the gene of a stress protein HSP47 which resides in the endoplasmic reticulum (ER) acting as a collagen-specific molecular chaperone in the pathway of collagen biosynthesis, processing and secretion. HSP47 specifically and transiently binds to various types of collagen in the ER. In addition to the binding specificity to collagen, the expression of HSP47 is always closely correlated with those of collagens during the normal development of mouse embryo as well as in the pathophysiological conditions including liver and renal fibrosis.

We already succeeded in making knockout mice lacking *hsp47* gene, which resulted in causing the embryonic lethality at 10.5 dpc in *hsp47*<sup>-/-</sup> homozygotic mice. In these homozygotic mice, the maturation of type I collagen was abnormal and the immature form of procollagen accumulated in the tissues. Using *hsp47*<sup>-/-</sup> ES cells, we found that type IV collagen secreted from *hsp47*-null cells could not form correct triple helices and the basement membrane was not formed in the embryoid bodies from those cells. We also observed the impairment of basement membrane formation in mouse embryos, thus these findings reveal that the knockout of a chaperone protein HSP47 causes the abnormality in molecular maturation of its substrate, and HSP47 is essential for mouse normal development. In those knockout mice, type IV collagen was observed to accumulate in the ER causing an ER stress, and apoptosis was also observed in those embryos after 10.5 dpc. Those procollagens accumulated in the ER of the Hsp47 knockout cells were eliminated by autophagy, not by ER-associated degradation.

We also established conditional knockout mice with LoxP-Hsp47 gene and after crossing the mice with Cre gene under type II collagen-promoter, we observed the mice with severe cartilage and bone formation with abnormal molecular maturation of type II collagen. Furthermore, we are constructing and analyzing tissue specific Hsp47 cKO mice as fibrosis model mice. (By K. Nagata)

Newly synthesized proteins obtain their native conformations by the assistance of molecular chaperones. However, the process of protein folding is error-prone, and polypeptides that failed to obtain the native structures enter the refolding cycle or are subjected to intracellular protein degradation. Many secretory proteins and membrane

proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER), and their folding is regulated by the ER quality control (ERQC). Terminally misfolded polypeptides in the ER are degraded by the cytoplasmic proteasomes after retrotranslocation through the ER membrane, a mechanism known as ER-associated degradation (ERAD). Many works have clarified the importance of ERAD of misfolded proteins and the disruption of ERQC in genetic diseases, neurodegenerative disorders, and diabetes mellitus. Since most of the proteins synthesized in the ER are *N*-glycosylated, ERQC of glycoproteins are regulated by the processing of the *N*-glycans and the recognition of specific *N*-glycans by the lectins. We are analyzing the function of mammalian EDEMs (ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like proteins), ERAD lectins OS-9 and XTP3-B, and HRD1-SEL1L ubiquitin-ligase complex embedded in the ER membrane. Recently, we identified the *N*-glycan structures and lectins that are used as the glycan-tags for the glycoprotein ERAD.

(By N. Hosokawa)

We are working on is the molecular mechanism of protein quality control by oxidoreductases in the ER. We identified that an ER disulfide reductase, ERdj5 promotes ERAD by cleaving of intermolecular disulfide bonds of misfolded proteins and preventing their oligomer and aggregate formation. And also ERdj5 interacts with EDEM, which recognizes misfolded proteins via their *N*-glycan portions, and a molecular chaperone, BiP for efficient ERAD. ERdj5 interacts with EDEM via the C-terminal thioredoxin-like domain cluster and recruits misfolded glycoproteins to ERdj5 and then the C-terminal cluster of ERdj5 cleaves their intermolecular disulfide bonds. BiP associates with ERdj5 through the J-domain in the N-terminus, and captures the reduced misfolded proteins. Recently, we have found that BiP transfers the substrates to the ERAD complex on the ER membrane. Taken together, we have identified the precise molecular mechanism of the ERAD promotion mediated by ERdj5. We also found that ERdj5 promotes degradation of non-glycosylated substrates, which are recruited via BiP. ERdj5 possesses two substrate recruit pathways and promotes ERAD of extensive substrates. Also, we have identified interaction partners among about 20 ER oxidoreductases by co-immunoprecipitation and followed by LC/MS analysis to elucidate redox cascades in the ER. Based on the analysis, we found that the redox complex composed of an ER oxidase, Ero1L and an ER oxidoreductase, PDI oxidize other ER oxidoreductases efficiently. We have found that an ER oxidoreductase, Prx4, which was recently identified as an alternative PDI oxidase, is localized in the ER by interacting with another ER oxidoreductase, ERp44.

(By J. Hoseki)

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- N. Hosokawa, LO. Tremblay, B. Sleno, Y. Kamiya, I. Wada, K. Kato, K. Nagata, and A. Herscovics : EDEM1 accelerates the trimming of  $\alpha$ 1, 2-linked mannose on the C branch of *N*-glycans. *Glycobiology* : **20**, 567-575 (2010).
- J. Hoseki, H. Sasakawa, Y. Yamaguchi, M. Maeda, H. Kubota, K. Kato & K. Nagata : Solution structure and dynamics of mouse ARMET. *FEBS. Letters*. **584** : 1536-1542 (2010).
- Y. Sugiura, K. Araki, S. Iemura, T. Natsume, J. Hoseki & K. Nagata : The novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *J. Biol. Chem.* **285** (10): 7135-7142 (2010).

## 2) 著書および総説

- N. Hosokawa, K. Kato, Y. Kamiya : Mannose 6-phosphate receptor homology domain-containing lectins in mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation. *Methods in Enzymology* : **480** (Ed. M. Fukuda) Elsevier, 181-197 (2010).
- N. Hosokawa, Y. Kamiya, K. Kato : The role of MRH domain-containing lectins in ERAD. *Glycobiology* : **20**, 651-660 (2010).
- J. Hoseki, R. Ushioda & K. Nagata : Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Journal of Biochemistry* **147** : pp.19-25 (2010).
- 

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- Nobuko Hosokawa, Yasutaka Iida, Katsuya Okawa, Kazuhiro Nagata : Formation of HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex that regulates the mammalian ERAD. The 3rd International Symposium on Protein Community, 奈良市, 2010.9.13-16
- 細川暢子 : 小胞体関連分解における HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体の機能 平成 22 年度京都大学再生医科学研究所学術講演会, 京都大学再生医科学研究所, 京都市, 2010.12.13 (ポスター発表)
- Tsutomu Fujimori, Yukiko Kamiya, Koichi Kato, Kazuhiro Nagata, and Nobuko Hosokawa : Functional analysis of a mammalian lectin XTP3-B in the endoplasmic reticulum quality control. The 3rd International Symposium on Protein Community, 奈良市, 2010.9.13-16
- 藤森 力, 神谷由紀子, 加藤晃一, 永田和宏, 細川暢子 : ヒト新規レクチン XTP3-B の機能解析. 特定領域研究「タンパク質の社会」第 3 回若手ワークショップ, 宗像市, 2010.07.1-3
- 藤森 力, 神谷由紀子, 加藤晃一, 永田和宏, 細川暢子 : Functional analysis of a mammalian lectin XTP3-B in the endoplasmic reticulum quality control. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸市, 2010.12.7-10
- 藤森 力 : ヒト新規レクチン XTP3-B が担う新たな小胞体品質管理機構, 平成 22 年度学術講演会若手発表会, 京都大学再生医科学研究所, 京都市, 2010.12.13 (口頭発表およびポスター)

### 2) 招待講演・シンポジウム

- 永田和宏 : 小胞体レドックス制御とタンパク質品質管理機構, 臨床研ミニシンポジウム「タンパク質の一生」, 東京都, 2010.2.10



## 生体微細構造学分野 Department of Ultrastructural Research

講師 平芳 一法

*Lect. Kazunori Hirayoshi*

### 【研究概要】

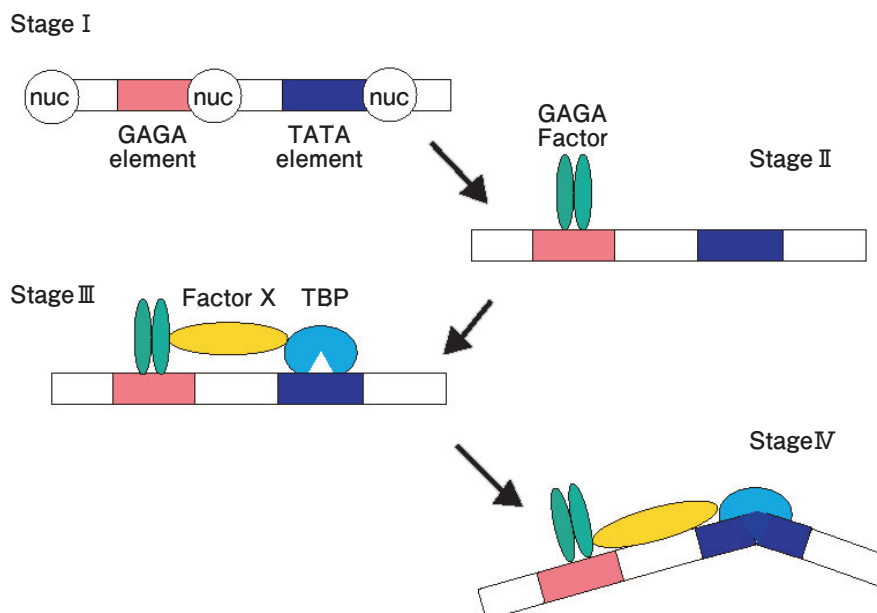
染色体に折りたたまれた DNA 上に記録された遺伝情報は、転写によって蛋白質の実質的な設計図である mRNA に読み替えられた後、正しい蛋白質に翻訳される。染色体構造は、必要なときにのみ遺伝子が転写されるように、転写因子の結合から DNA を守るように機能している。つまり、染色体構造を介した制御も転写制御に深く関わっている。ショウジョウバエでは、染色体の基本構造であるクロマチン構造による遺伝子の不活化を乗り越え、転写可能な状態をつくる過程に関与する因子として GAGA 因子が知られている。この因子の持つ機能の一つが、転写制御領域に存在する GAGA 配列に特異的に結合し、クロマチンリモデリングに必要な因子をリクルートすることである。また、転写活性そのものへの関与、転写の実体酵素である RNA PolymeraseII と、転写の開始から終了まで行動を共にしているという報告もあり、さらに広範な機能が予想される。転写、特に伸長反応を考える上でも重要な因子と考えられる。この因子の生体内における機能を明らかにするため、われわれは GAGA 因子特異的なアプタマーを取得し、詳細な解析を続けている。

我々の取得したアプタマーは、他の因子あるいは自己の重合化に関与する POZ ドメインを中心とした領域に結合し、転写を阻害する。GAGA 因子自体で転写活性があるとされているのは、C 末端側に存在する Qrich 領域とされており、我々のアプタマーによる転写阻害は、転写複合体に何らかの影響を及ぼしたためと考えられる。転写複合体は、複数の因子によって成立し、因子間のコミュニケーションによって高度な制御がなされている。つまり、アプタマーによる転写阻害は、GAGA 因子を介して存在する転写複合体中の因子間の結合を阻害することにより、生じたものと思われる。すでに取得していた主要な基本転写因子である TBP (TATA binding protein) に対するアプタマーを併用した解析により、GAGA 因子が、TBP の転写複合体上へのリクルート関与していることを明らかにした。

ショウジョウバエの発生やストレス応答などに関与する遺伝子の多くは、GAGA 因子依存的遺伝子として知られるが、その依存性は、転写制御領域に存在する GAGA 配列への結合とは別の機構によって複合体中にリクルートされている可能性を示した。研究ツールとしてのアプタマーの活用が、基本転写における転写複合体の詳細な解析を可能にすることを示した。

近年注目されている抗体医薬と同等の機能が期待される RNA アプタマーの特異的な応用方法の一つとして、異なる結合領域を持つアプタマーをつなぐことにより、抗体とは異なる、ユニークな活性を示せることを示した。この方法は、抗体とは異なる活用法を示したものである。生体内では一定時間で分解されるという特徴を生かし、必要なときにのみ働く、副作用の少ない薬剤となるよう、その分子の有効な構築を試みている。

The binding of the transcription factor is inhibited by the chromosome structure to prevent the improper transcription. To overcome this structure for starting the proper transcription, GAF has a critical role in *Drosophila* transcription. GAF (GAGA factor) is well known as a multifunctional factor. It has been reported that this factor in-



#### 転写複合体における GAGA 因子の機能

- Step I : GAGA 因子が結合する以前の転写調節領域はクロマチン構造で守られている。  
 Step II : GAGA 因子の結合により、クロマチン構造が消失し、転写可能な状態、転写因子が結合可能な状態になる。  
 Step III : TBP (TATA binding protein) を含む基本転写因子等の転写複合体を形成する因子が結合する。  
 Step IV : GAGA 因子の存在により、転写複合体の構造が安定し、効率的な転写が可能になる。

#### The function of GAGA factor in the transcription complex

- Step I : Promoter region is packed by nucleosome structure to protect the binding of transcription factors before GAGA factor binding.  
 Step II : Binding of GAGA factor induces remodeling of nucleosome structure and potentiates the transcription complex formation.  
 Step III : Basic transcription factors including TBP bind to the promoter region.  
 Step IV : Presence of GAGA factor stabilizes the transcription complex and makes an effective transcription.

involves a nucleosome remodeling at promoter region, a formation of promoter proximal pausing of RNA polymerase II, and the transcription elongation. In addition, the characteristic glutamine rich domain of GAF has a potential to activate the transcription by stabilizing the PIC. GAF is also reported that moves with RNA polymerase II all way down to the 3' end of the gene. To analyze the role of GAF in the transcription complex precisely, we tried a new analytical approach with RNA aptamer as a molecular forceps. We obtained two kinds of aptamer which bind to GAF with a high affinity. These aptamers bound to the POZ domain of GAF, which is important for the protein-protein interaction, but not to the zinc finger and the glutamine rich domain, although aptamers weakly prevented the GAF from binding to the GAGA element. Interestingly, these aptamers inhibited the *in vitro* transcription on the naked DNA template. One aptamer showed the inhibitory effects on the transcription from the promoters containing GAGA elements when adding the aptamer before the transcription initiation. The other showed the inhibitions after the transcription initiation. The effect of this aptamer was independent of whether the presence or absence of the GAGA element at the promoter region. However this effect was observed only on the transcription from the GAF-dependent promoter, not from the GAF-independent promoter. These results suggest the functions of GAF in initiation, elongation or re-initiation steps via the interaction with other factors in the transcription apparatus, which imply the importance of GAF as a regulator throughout the whole process of transcription.

RNA aptamer is expected as a substituent of antibody therapy. We succeeded to establish the multi-recognition molecule that recognizes the different molecule. To expand the application of RNA aptamer as a cure

drug or examination reagent, we tried to establish the construct protocol for more effective aptamers.

## 【業績目録】

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 学会発表

法邑賢一・平芳一法：転写初期段階におけるクロマチン関連因子を核とした因子間ネットワークの解明第33回日本分子生物学会物学会年会，第83回日本生化学会大会合同大会(2010.12.7-10. 神戸)



## 生体機能調節学分野 Department of Experimental Pathology

分野主任 教授 坂口 志文

*Prof. Shimon Sakaguchi*

### 【研究概要】

#### (1) 免疫寛容の基礎的研究

正常な免疫系は、非自己抗原に対して免疫応答を示すが、正常自己構成成分に対しては反応しない。また、アレルギーに見られる過剰な免疫応答を阻止する機構を有している。このような免疫自己寛容、免疫恒常性維持の基礎的メカニズムとして、制御性 T 細胞による抑制的制御が重要である。その機能異常は自己免疫病、アレルギーの原因となる。制御性 T 細胞の免疫学的特徴のひとつは、胸腺での制御性 T 細胞の選択に際し、T 細胞抗原レセプター (TCR) のレパトアが、自己反応性を獲得することである。この自己反応性により、制御性 T 細胞は効果的に免疫自己寛容を維持する。本年度、制御性 T 細胞が自己反応性を獲得するメカニズムについて解析を進めた。その結果、制御性 T 細胞は前駆細胞段階から CTLA-4 分子を発現し、副刺激分子 CD80/CD86 と CD28 分子の相互作用を阻害することで、CD28 シグナルを減弱化し、これを補償できる自己抗原高親和性を有する制御性 T 細胞の選択を許すとの結果を得た。実際、制御性 T 細胞特異的 CTLA-4 欠損マウスでは自己反応性 TCR レパトアが形成されず、逆に T 細胞特異的に CTLA-4 を高発現するトランスジェニックマウスを作製することで、正常 T 細胞に自己反応性 TCR レパトアを付与できた。以上の知見は、制御性 T 細胞の TCR レパトア形成に CTLA-4 の発現が重要であることを意味する。

#### (2) 自己免疫、腫瘍免疫、移植免疫の基礎的研究

本年度、T 細胞シグナル分子 ZAP-70 に一塩基突然変異を有し自己免疫病を自然発症する SKG マウスを用いて、内在性制御性 T 細胞、自己反応性 T 細胞の TCR レパトアがどのように形成されるか、について解析した。skg 変異がホモ (skg/skg)、ヘテロ (skg/+) のマウス、あるいは ZAP-70 遺伝子欠損マウスと交配して作製した skg/null マウスの TCR レパトアを比較した結果、胸腺に発現する自己抗原に強親和性 TCR を発現する T 細胞は、TCR を介する強シグナルによりアポトーシスに陥り“負の選択”を受けるが、ZAP-70 異常を有する T 細胞ではそのような T 細胞が“負の選択”を免れる結果、TCR レパトアは自己反応性に偏るとの知見を得た。一方、制御性 T 細胞レパトアは、skg 変異の結果、その他の T 細胞に比較して、顕著に自己反応性に偏っていた。この結果は、TCR 近傍シグナル分子の異常により T 細胞が自己反応性を獲得するメカニズムを明らかにしたものである。上述の CTLA-4 の結果と合わせると、細胞内シグナル分子 (例えば ZAP-70)、細胞表面分子 (例えば CTLA-4) を介して、TCR シグナルを減弱させる遺伝的因子は TCR レパトアを自己反応性に偏移させると考えられ、自己免疫病の遺伝的感受性の決定に重要と考えられる。

#### (3) 新しい動物モデルを用いた関節リウマチの原因・発症機構の研究

上述のように、SKG マウスは、免疫病理学的にヒトの関節リウマチと酷似する慢性関節炎を自然発症する。関節炎の発症を媒介するのは IL-17 を産生する Th17 細胞である。本年度、ZAP-70 遺伝子変異の結果産生された自

自己反応性 T 細胞がどのようにして Th17 細胞に分化するかに関して研究を進めた。その結果、昨年までに報告した TLR あるいは Dectin-1 を介する刺激のみならず、補体の活性化によって作られる C5a フラグメントが、マクロファージなどに発現する C5a レセプターを介して IL-6 の産生を誘導し、T 細胞の Th17 細胞への分化を促進するとの知見を得た。さらに、補体活性化経路について解析を進め、補体活性化の 3 経路(classical, lectin, and alternative pathways)いずれの刺激でも Th17 分化を誘導できることを証明した。この結果は、感染症などによる血中補体の活性化は関節リウマチのトリガーになる可能性を意味する。

This department studies: (i) the cellular and molecular basis of immunologic self-tolerance and the etiology of autoimmune disease; (ii) the strategy for eliciting effective immune responses to autologous tumor cells, or inducing immunologic tolerance to organ transplants, by manipulating the mechanism of immunologic self-tolerance; and (iii) the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis by utilizing an animal model established in our laboratory.

One aspect of immunologic self-tolerance(i.e., immunological unresponsiveness of the normal immune system to normal self-constituents) is actively maintained through a T cell-mediated dominant control of self-reactive T cells by naturally occurring regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (Tregs). We previously showed that the transcription factor Foxp3 is a master regulator of their development and function. Another cardinal feature of Tregs is that they have the TCR repertoire skewed to recognizing self-antigen and therefore good at controlling autoimmune responses.

This year, we have attempted to understand the molecular mechanism by which self-reactive TCR repertoire of Tregs is established. By transgenic overexpression of CTLA-4 in developing T cells in the thymus, we showed that TCR repertoire could be skewed to be self-reactive. On the other hand, Treg-specific CTLA-4 deficiency cancelled self-skewing of TCR repertoire of Tregs. As the mechanism of this CTLA-4-dependent TCR repertoire skewing, high expression of CTLA-4 outcompeted CD28 for binding to CD80/CD86 expressed in thymic stromal cells, reducing CD28 signal to developing T cells and thereby allowing the generation of T cells with high enough self-reactive TCRs to compensate the CD28 signal reduction.

By utilizing SKG mice, which bear a mutation in the gene encoding the C-SH2 domain of the T cell signaling molecule ZAP-70, we showed another mechanism of TCR self-skewing based on the modulation of TCR signaling. We prepared +/+, skg/+, skg/skg, and skg/null BALB/c mice and compared the degree of their signaling anomaly and skewing of TCR repertoire due to altered T cell selection in the thymus. TCR signaling intensity indeed decreased in the order of +/+, skg/+, skg/skg, to skg/null, and accordingly, TCR repertoire was more severely skewed to self-reactivity in this order. The results indicate that, like CTLA-4 overexpression that leads to the reduction of CD28 signaling, attenuation of TCR proximal signaling by a ZAP-70 mutation can skew the TCR repertoire to be self-reactive. This explains how natural Tregs acquire self-reactive TCRs competent to control autoimmunity.

SKG mentioned above spontaneously develop T cell-mediated autoimmune arthritis immunopathologically similar to rheumatoid arthritis (RA) in humans. The disease is mediated by CD4<sup>+</sup> T cells secreting IL-17, called Th17 cells. We showed previously that the differentiation of self-reactive T cells to Th17 autoimmune effector T cells in SKG mice was dependent on stimulation of antigen-presenting cells via TLRs or Dectin-1 to produce IL-6. This year, we have shown that C5a, a product of complement activation, can also activate macrophages via C5a receptor

and trigger their production of a large amount of IL-6. The produced IL-6, together with tissue TGF- $\beta$ , drives self-reactive CD4<sup>+</sup> T cells to Th17 cells. The results indicate that complement activation by microbial infections may trigger RA in genetically susceptible individuals via the expansion of Th17 arthritogenic T cells. Further, complement products can be a good target for treating and preventing RA in humans.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Ohkura, N., and Sakaguchi, S. Development of regulatory T cells: regulation of Foxp3 expression by pharmacological agents. *Trends in Pharmacological Sciences*. In press.
- Miyara, M., and Sakaguchi, S. FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol. Cell. Biology*. In press.
- Hashimoto, M., Hirota, K., Yoshitomi, H., Maeda, S., Teradaira, S., Akizuki, S., Prieto-Martin, P., Nomura, T., Sakaguchi, N., Köhl, J., Heyman, B., Takahashi, M., Fujita, T., Mimori, T., Sakaguchi, S. Complement drives Th-17 cell differentiation and triggers autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 207 : 1135-43, 2010.
- Sakaguchi, S. Conditional stability of T cells. *Nature*. 468 : 41-42, 2010.
- Tanaka, S., Maeda, S., Hashimoto, M., Teradaira, S., Hirota, K., Yoshitomi, H., Katakai, T., Shimizu, A., Nomura, T., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J. Immunol.* 185 : 2295-305, 2010.
- Wing K, and Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self-tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 11 : 7-13, 2010.
- Ohkura N, Sakaguchi S. Foxo1 and Foxo3 help Foxp3. *Immunity*. 33 : 835-7, 2010.
- Sakaguchi, S. Regulatory T cells: history and perspective. In Regulatory T cells: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 77 : 1-13, 2010.
- Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer*. 127 : 759-67, 2010.
- Ohkura, N., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin. Immunopathol.* 32 : 95-106, 2010.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, and Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human system. *Nat. Rev. Immunol.* 185 : 2295-305, 2010.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Zhao, T., Yoshida, M., Miyazato, P., Takai, K., Shimizu, K., Oshima, K., Green, P. L., Ohkura, N., Yamaguchi, T., Ono, M., Sakaguchi, S., and Matsuoka, M. Dysregulation of regulatory T cells by HTLV-1 bZIP factor leads to systemic inflammation and lymphomagenesis. *PlosPathol.* In press.
- Peterson, L. K., Shaw, L. A., Joetham, A., Sakaguchi, S., Gelfand, E. W., and Dragone, L. L. SLAP Deficiency Enhances Number and Function of Tregs Preventing Chronic Autoimmune Arthritis in SKG Mice. *J. Immunol.* In press.
- Côté AL, Zhang P, O'Sullivan JA, Jacobs VL, Clemis CR, Sakaguchi S, Guevara-Patiño JA, Turk MJ. Stimulation of the glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor on CD8 T cells induces protective and high



- avidity T cell responses to tumor-specific antigens. *J. Immunol.* 186 : 275-83, 2011.
- Snell LM, McPherson AJ, Lin GH, Sakaguchi S, Pandolfi PP, Riccardi C, Watts TH. CD8 T cell-intrinsic GTR is required for T cell clonal expansion and mouse survival following severe influenza infection. *J. Immunol.* 185 : 7223-34, 2010.
- Fujii H, Arakawa A, Kitoh A, Miyara M, Kato M, Kore-Eda S, Sakaguchi S, Miyachi Y, Tanioka M, Ono M. Perturbations of both non-regulatory and regulatory FOXP3(+) T cells in patients with malignant melanoma. *Br J Dermatol.* In press.
- Nafady-Hego, H., Li, Y., Ohe, H., Zhao, X., Satoda, N., Sakaguchi, S., Wood, K., Uemoto, S., and Koshiba, T. The generation of donor-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> naïve regulatory T cells in operationally tolerance patients after pediatric living-donor liver transplantation. *Transplantation.* 90 : 1547-55, 2010.
- Mitsui J, Nishikawa H, Muraoka D, Wang L, Noguchi T, Sato E, Kondo S, Allison JP, Sakaguchi S, Old LJ, Kato T, Shiku H. Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin. Cancer Res.* 16 : 2781-91, 2010.
- Saini M, Sinclair C, Marshall D, Tolaini M, Sakaguchi S, and Seddon B. Regulation of Zap70 expression during thymic development allows temporal separation of CD4 and CD8 repertoire selection at different signaling thresholds. *Science Signaling.* 3(114): ra23.
- Teng, M. W., Swann, J. B., von Scheidt B, Sharkey, J., Zerafa, N., McLaughlin, N., Yamaguchi, T., Sakaguchi, S., Darcy, P. K., and Smyth, M. J. Multiple antitumor mechanisms downstream of prophylactic regulatory T-cell depletion. *Cancer Res.* 70 : 2665-2674, 2010.
- Haque A, Stanley AC, Amante FH, Rivera FD, Zhou Y, Kuns RD, Yardley V, Sakaguchi S, Hill GR, Engwerda CR. Therapeutic Glucocorticoid-Induced TNF Receptor-Mediated Amplification of CD4<sup>+</sup> T Cell Responses Enhances Antiparasitic Immunity. *J Immunol.* 184 : 2583-2592, 2010.
- Caetano-Lopes J, Nery AM, Canhao H, Duarte J, Cascao R, Rodrigues A, Perpetuo IP, Abdulghani S, Amaral PM, Sakaguchi S, Konttinen YT, Graca L, Vaz MF, Fonseca JE. Chronic arthritis leads to disturbances in the bone collagen network. *Arthritis Res Ther.* 12(1):R9, 2010.

## 2) 総 説

- 大倉永也, 坂口志文 : Foxp3 による免疫抑制のメカニズム, 炎症と免疫. Vol.18, No.1, 64-68, 2010.
- 前田伸治, 坂口志文 : T 細胞レセプターのシグナル異常と自己免疫疾患, 臨床免疫・アレルギー科. Vol.53 No.5(509-516), 2010.
- 山口智之, 坂口志文 : 制御性 T 細胞 Trends in Hematological Malignancies. Vol.2 No.2, 44-46, 2010.
- 大崎一直, 坂口志文 : ヒト FOXP3<sup>+</sup>制御性 T 細胞のサブセット 臨床免疫・アレルギー科. Vol.53, No.6, 647-654, 2010.
- 山口智之, 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫抑制－制御性 T 細胞におけるサイトカイン実験医学 Vol.28, No.12, 134-138, 2010.
- 大倉永也, 坂口志文 : 制御性 T 細胞の分化および機能発現－外来性刺激およびサイトカインを介した制御性 T 細胞の分化. 医学のあゆみ. Vol.234, No.5, 433-437, 2010.

◆ 学会等の講演 ◆

1) 学会・研究会発表

- Motomu Hashimoto: Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. Kyoto T Cell Conference 第20回学術集会 (2010.6.4-5. 京都)
- 秋月修治: T細胞シグナル不全による制御性T細胞分化・機能障害と自己免疫病の発症 Kyoto T Cell Conference 第20回学術集会 (2010.6.4-5. 京都)
- M. Hashimoto, K. Hirota, H. Yoshitomi, S. Maeda, S. Akizuki, P. Prieto-Martin, T. Nomura, N. Sakaguchi, J. Kohl, B. Heyman, M. Takahashi, T. Fujita T. Mimori, S. Sakaguchi: Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2010.8.22-27. 神戸)
- S. Maeda, S. Tanaka, C. Fujimori, T. Nomura, K. Hirota, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi: Attenuation of T cell receptor signaling causes autoimmune disease. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2010.8.22-27. 神戸)
- T. Yamaguchi, A. Kishi, M. Osaki, S. Sakaguchi: Construction of regulatory T cells without FoxP3. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2010.8.22-27. 神戸)
- N. Ohkura, M. Hamaguchi, K. Sugimura, A. Tanaka, N. Sasaki S. Sakaguchi: Analysis of epigenetic status in regulatory T cells. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2010.8.22-27. 神戸)
- S. Akizuki, N. Sakaguchi, S. Maeda, Y. Ito, M. Hashimoto, T. Nomura, T. Saito, T. Mimori, S. Sakaguchi: Autoimmune disease caused by Treg insufficiency due to defective TCR signaling. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2010.8.22-27. 神戸)

2) 講演・シンポジウム

- 坂口志文: Control of Immune Responses by Regulatory T Cells 科学技術振興調整費シンポジウム, 免疫制御を基盤とする難病克服のための創薬イノベーション (2010.1.22. 京都)
- 坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御 肝免疫フォーラム (2010.2.6. 東京)
- Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. 8<sup>th</sup> EAACI-GAZLEN-Immunology Winter School (2010.2.11-14. Garmish-Partenkirchen, Germany)
- 坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御. 第6回皮膚免疫疾患研究会 (2010.4.8. 大阪)
- 坂口志文: SKGマウスにおける関節炎発症のメカニズム. 第54回日本リウマチ学会総会・学術総会 (2010.4.22-25. 神戸)
- Shimon Sakaguchi: State-of-the-Art Address. Regulatory T cells for immunological tolerance. American Transplantation Congress 2010 (2010.5.1-5. San Diego, USA)
- Shimon Sakaguchi: Control of Immune Responses by Regulatory T Cells. Gladstone Institute of Virology and Immunology Seminar Series (2010.5.6. San Francisco, USA)
- Shimon Sakaguchi: T cell signaling, regulatory T cells, and self-tolerance. 97<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Immunologist (2010.5.7-11. Baltimore, USA)
- Motomu Hashimoto: Innate immunity for Th17-mediated autoimmune disease. The 4<sup>th</sup> International Symposium of WPI-IFReC (2010.6.1-2. 大阪)
- 坂口志文: 制御性T細胞とサプレッサーT細胞. 東京大学グローバルCOE特別セミナー (2010.6.3. 東京)

- Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells in Innate and Adaptive Immunity. 2010 Keystone Symposia Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity (2010. 6.7-12. Dublin Ireland)
- 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御. 第 26 回日本 DDS 学会 (2010. 6. 17-18. 大阪)
- Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. iFReC-New Zealand Immunology Workshop (2010. 6. 17-18. 大阪)
- Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. International Conference in Sapporo 2010 (2010. 7. 2. 札幌)
- Shimon Sakaguchi: Treg cells. 14<sup>th</sup> Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (2010. 7.11-15. Hong Kong China)
- Shimon Sakaguchi: Th17 and Treg in inflammatory diseases. 14<sup>th</sup> Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (2010. 7.11-15. Hong Kong China)
- Shimon Sakaguchi: Keynote lecture Construction of regulatory T cells without Foxp3. The second International Conference on Regulatory T Cells and Th17 Cells and Clinical Application in Human Diseases China Tregs/Th17 (2010 7.17-20 Shanghai China)
- Shimon Sakaguchi: T cell signaling, Treg, and autoimmunity. The second International Conference on Regulatory T Cells and Th17 Cells and Clinical Application in Human Diseases China Tregs 2010 (2010 7.17-20 Shanghai China)
- 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御. 第 7 回生物学的製剤治療研究会 (2010. 7. 22. 横浜)
- Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for self-tolerance. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2010. 8. 22-27. 神戸)
- Shimon Sakaguchi: Lunchtime Lecture Regulatory T cells for immunological tolerance and immune homeostasis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2010. 8. 22-27. 神戸)
- Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for immunological tolerance and immune homeostasis. International Symposium for Immunology of Reproduction (ISIR-Osaka 2010) (2010. 8.28-29. 大阪)
- 坂口志文: 制御性 T 細胞の発見と癌治療への応用. 第 9 回日本婦人科がん分子標的研究会 (2010. 9. 10. 大津)
- Shimon Sakaguchi: Altered TCR signaling as a cause of autoimmune disease. FROM THE LABORATORY TO THE CLINIC: Differences between immunity and inflammation in mice and men: Reasons for translational failures? (2010.9.20-23. Oxford UK)
- Shimon Sakaguchi: T cell signaling, regulatory T cells and self-tolerance. 40<sup>th</sup> Annual Meeting German Society for Immunology (2010. 9.22-25. Leipzig Germany)
- Shimon Sakaguchi: T-cell signaling, regulatory T cells and self-tolerance 8<sup>th</sup> German-Japan Symposium (2010. 9.26-29. Cuxhaven Germany)
- 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御. 日本臨床検査自動化学会第 42 回大会 (2010.10.7-9. 神戸)
- 坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御. 第 4 回川島糸球体カンファレンス (2010.10.23-24. 岐阜)
- Shimon Sakaguchi: The molecular basis of the development and function of regulatory T cells. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine International Symposium/Retreat 2010 (2010. 11. 5-6. 淡路島)
- Shimon Sakaguchi: T cell signaling, regulatory T cells and self-tolerance. The 2010 Cold Spring Harbor Asia Conference: Frontier of Immunology in Health & Diseases (2010. 11.7-10. Suzhou China)

Shimon Sakaguchi : The molecular basis of the development and function of regulatory T cells. The 2010 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists (2010. 11. 18-19. Seoul Korea)

Shimon Sakaguchi : The molecular basis of the development and function of regulatory T cells. Joint Symposium of CRCID & PCBMI Vaccine & Inflammation (2010. 11. 20. Seoul Korea)

Shimon Sakaguchi : Overview and Mechanisms of Treg Suppression. British Society for Immunology Annual Congress (2010. 12. 6-10. Liverpool UK)



## 生体システム制御学分野 Department of Medical Systems Control

分野主任 教授 長澤 丘司

*Prof. Takashi Nagasawa*

### 【研究概要】

リンパ球を含むすべての血液細胞やその前駆細胞は、骨の中心部の骨皮質に囲まれた空間である骨髓で造血幹細胞から一生涯にわたり恒常的に産生される。造血幹細胞や前駆細胞は、骨髓の中に想定されているニッチ(niche)と呼ばれる特別な微小環境で維持され、その増殖・分化が調節されていると推測されてきたがこの造血ニッチの実体は長年不明である。2003年、米国のLiらは、骨辺縁の骨芽細胞の一種でありNカドヘリンを高発現するSNO細胞が造血幹細胞ニッチを形成することを報告し注目された(Zhang, J., et al. *Nature* 425, 836-841(2003))。一方、米国のMorrisonらは、造血幹細胞の多くは骨髓腔内で網の目のように分布する洞様毛細血管の周囲に存在することを報告した(Kiel, MJ., et al. *Cell* 121, 1109-1121(2005))。しかし、Liらの報告の根拠となった造血幹細胞の組織学的観察法は十分とは言えず(Kiel, MJ., et al. *Nature* 449, 238-242(2007))、いずれの報告においてもそれぞれのニッチ細胞の機能が証明されるには至っていない。

私たちは、これまでに、ケモカインCXCL12とその生理的受容体CXCR4が、胎生期における造血幹細胞の骨髓へのホーミング(細胞が臓器に移動、定着すること)、成体骨髓での造血幹細胞の維持やBリンパ球の産生に必須であることを明らかにし(Nagasawa, T., et al. *Nature* 382, 635-638(1996); Tachibana, K., et al. *Nature* 393, 591-594(1998); Egawa, T., et al. *Immunity* 15, 323-334(2001); Ara, T., et al. *Immunity* 19, 257-267(2003); Sugiyama, T., et al. *Immunity* 25, 977-988(2006))、CXCL12の生理的な発現細胞を可視化することができるCXCL12遺伝子座にGFP遺伝子を挿入したマウス(CXCL12-GFPノックインマウス)を用いて、成体骨髓において間質の細網細胞(ストローマ細胞)の一部に骨髓腔内にびまん性に分布しCXCL12を高発現する細胞(以下CXCL12-abundant reticular (CAR)細胞)が存在することを見出した。また、洞様毛細血管の大部分はCAR細胞に取り囲まれており、造血幹細胞を濃縮する分画内の細胞、早期のBリンパ球前駆細胞や最終分化したB細胞である形質細胞(抗体産生に特化した細胞)の大部分がCAR細胞の長い細胞突起に接着しておりCAR細胞が造血幹細胞・前駆細胞のニッチである可能性が示唆された(Tokoyoda, K., et al. *Immunity* 20, 707-718(2004); Sugiyama, T., et al. *Immunity* 25, 977-988(2006))。

\*

そこで、私たちはCAR細胞の性状(どのような細胞か?)を明らかにし、CAR細胞の生体でのニッチとしての機能を証明するため、ジフテリア毒素(DT)との結合により細胞死が誘導されるDT受容体遺伝子を用いた特異的細胞欠損システムによりCAR細胞特異的な欠損を誘導することができるマウスを作製した(Omatsu, Y., et al. *Immunity* 33, 387-399(2010))。CAR細胞欠損の二次的影響でなく、直接的な影響を観察するため欠損誘導後短期間(2日)後の骨髓を解析した(以後CAR細胞欠損マウス)。DT投与後2日間でCAR細胞は著減したが他のニッチ候補細胞である骨芽細胞や血管内皮細胞は投与前と同様に存在していた。造血幹細胞の細胞数は軽度減少していたが、細胞が小さくなっており、細胞周期が静止期からG1期に入ると発現する細胞周期促進遺伝子の発現量が著明に低下していた。興味深いことに骨髓球への分化を誘導する転写因子PU.1の発現量が造血幹細胞分画で著明に増加していた。以上より、CAR細胞は、造血幹細胞の増殖と未分化性の維持に必須であることが示された。また、CAR

細胞欠損マウスでは、増殖している B 細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞の細胞数が著明に減少しており、CAR 細胞はこれらの前駆細胞の増殖にも必須であることが示された。また、CAR 細胞欠損マウスでは、骨髄の CXCL12、SCF の蛋白量が著明に減少しており、CAR 細胞は造血に必須であるこれらのサイトカインの骨髄での主たる産生細胞であることが示された。

一方、個々の CAR 細胞は、その大部分が骨芽細胞、脂肪細胞の発生に必須の転写因子の遺伝子を両方発現しており、それぞれへの分化を誘導する条件で試験管内培養を行うと CAR 細胞の大部分が骨芽細胞または脂肪細胞に分化した。また、CAR 細胞欠損マウスの骨髄細胞は、試験管内培養系で産生される骨芽細胞、脂肪細胞の細胞数が著明に減少していた。これらの結果より、CAR 細胞は骨芽細胞・脂肪細胞共通前駆細胞であることが示された。

以上より、CAR 細胞は、造血幹細胞の増殖と未分化性の維持、造血前駆細胞の増殖に必須のニッチとして働く骨芽細胞・脂肪細胞共通前駆細胞であることが明らかになり、造血を支持する骨髄のニッチ細胞についての理解が大きく進んだ。現在、CAR 細胞の作用機構と標的造血細胞の特異性、炎症や感染症での造血調節における CAR 細胞の機能とこれを制御する分子機構、CAR 細胞の白血病幹細胞ニッチとしての機能等、今回の研究成果より生じてきた重要な問題に取り組んでいる。

Chemokines are a large family of small structurally related cytokines that are thought to regulate cell trafficking and utilize seven-transmembrane spanning G-protein-coupled receptors (GPCR). We identified CXC chemokine ligand 12 (CXCL12), also known as stromal cell-derived factor (SDF)-1 as pre-B-cell growth stimulating factor and found that CXCL12 and its primary receptor CXCR4 are essential for hematopoiesis, including colonization of bone marrow by hematopoietic stem cells (HSCs) during ontogeny, maintaining a pool of HSCs in adult bone marrow and development of B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) as well as cardiogenesis and organ vascularization during ontogeny (Nagasawa, T., et al. *Nature* 382, 635-638 (1996); Tachibana, K., et al. *Nature* 393, 591-594 (1998); Egawa, T., et al. *Immunity* 15, 323-334 (2001); Ara, T., et al. *Immunity* 19, 257-267 (2003); Sugiyama, T., et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006)). In recent years, we have identified a small population of non-hematopoietic cells expressing high amounts of CXCL12, termed CXCL12-abundant reticular (CAR) cells with long processes. We have revealed that CAR cells were scattered throughout bone marrow and that most HSCs, early B cell precursors, the end-stage B lymphocytes, plasma cells and pDCs were attached to the processes of CAR cells, suggesting that CAR cells function as the special microenvironments, termed 'niches' for HSCs, B lymphocytes and pDCs (Tokoyoda, K., et al. *Immunity* 20, 707-718 (2004), Sugiyama, T., et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006)). Although it has been reported that a population of osteoblasts, termed spindle-shaped N-cadherin-positive osteoblastic (SNO) cells (endosteal niches) or endothelial cells (vascular niches) function as niches for HSCs, we hypothesize that CAR cells are a key component of HSC niches, including both endosteal and vascular niches in adult bone marrow (Sugiyama, T., et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006)). These results raise a question what is the nature and in vivo function of CAR cells.

To address this issue, we generated mice that allow selective ablation of CAR cells within bone marrow and determined the nature and in vivo function of CAR cells as a niche for HSCs and lympho-hematopoietic progenitors (Omatsu, Y., et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010)). Short-term ablation of CXC chemokine ligand (CXCL) 12-abundant reticular (CAR) cells in vivo did not affect candidate niches, bone-lining osteoblasts or endothelial cells but severely impaired the adipogenic and osteogenic differentiation potential of marrow cells and production of SCF and CXCL 12, and led to a marked reduction in cycling lymphoid and erythroid progenitors. HSCs from CAR cell-depleted

mice were reduced in number and cell size, were more quiescent and had increased expression of early myeloid selector genes, similar to the phenotype of wild-type HSCs cultured without a niche. Thus, the niche composed of adipo-osteogenic progenitors is required for proliferation of HSCs and lymphoid and erythroid progenitors as well as maintenance of HSCs in an undifferentiated state, although HSC quiescence can be maintained by non-niche environments.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

(\* corresponding author)

\*Janas, ML., Varano, G., Gudmundsson, K., Noda, M., Nagasawa, T., \*Turner, M.

Thymic development beyond b-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4.

**J. Exp. Med.** 207(1) : 247-261, 2010.

Omatsu, T., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., \*Nagasawa, T.

The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche.

**Immunity** 33(3) : 387-399, 2010.

Sanematsu, F., Hirashima, M., Laurin, M., Takii, R., Nishikimi, A., Kitajima, K., Ding, G., Noda, M., Murata, Y., Tanaka, Y., Masuko, S., Suda, T., Meno, C., Côté, JF., Nagasawa, T., \*Fukui, Y.

Dock 180 is a rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4.

**Circ. Res.** 107(9) : 1102-5, 2010.

Noda, M., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Oishi, S., Fujii, N., \*Nagasawa, T.

CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK cell development in adult mice.

**Blood** (in press)

Lei, Y., Ripen, AM., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, LT., Bösl, MR., Holländer, GA., Hayashi, Y., de Waal Malefyt, R., Nitta, T., \*Takahama, Y.

Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development.

**J. Exp. Med.** (in press)

#### 2) 和文総説

長澤丘司, 尾松芳樹, 杉山立樹 : “幹細胞の維持と血管性ニッチ” 細胞工学 vol.29, No.11, 1082-1086, 2010.

-----

◆ 学会等の発表 ◆

1) 招待講演

T. Nagasawa, 14th International Congress of Immunology. Symposium : cellular trafficking. “The chemokine CXCL12 and niches for hematopoietic stem cells and immune cells” (August 24 (23-27), 2010, Kobe, Japan)

T. Nagasawa, 3rd International Conference on Osteoimmunology. “The chemokine CXCL12 and bone marrow niches for hematopoietic stem cells (HSCs) and immune cells.” (June 21-25, 2010, Fira, Santorini, Greece)

T. Nagasawa, The 2010 fall conference of the Korean Association of Immunologists, Symposium : Genetic networks controlling late B cell differentiation. “Bone marrow niches for lympho-hematopoietic stem and progenitor cells” (2010. 11. 18-19, Seoul, Korea)

T. Nagasawa, Kyoto University Global COE Retreat 2010 “Bone marrow niches for hematopoietic stem and progenitor cells.” (2010. 11. 06. Awaji, Japan)

長澤丘司 京都大学再生医科学研究所 再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点 平成 22 年度学術講演会, “骨髄の造血幹細胞・前駆細胞を維持するニッチ～その実体と機能～”(2010.12.13. 京都)

長澤丘司 第 222 回松本歯科大学大学院セミナー, “骨髄の幹細胞・前駆細胞ニッチとケモカイン CXCL12”(2010.10.01. 塩尻)

長澤丘司 第69回日本癌学会学術総会, モーニングレクチャー, “骨髄における幹細胞ニッチとその機能”(2010.9.23. 大阪)

長澤丘司 第 17 回八幡平造血セミナー, 特別講演, “骨髄の造血幹細胞ニッチとケモカイン CXCL12”(八幡平造血セミナー山形県実行委員会)(2010.9.11. 盛岡)

長澤丘司 第 31 回日本炎症・再生医学会, ミニシンポジウム(骨免疫学と血管生物学の新展開), “骨髄の造血幹細胞ニッチと血管”(2010.8.6. 東京)

長澤丘司 第 12 回新潟血液研究会, 特別講演, “骨髄の造血幹細胞ニッチとケモカイン CXCL12”(2010.5.28. 新潟)

長澤丘司 再生医療の実現化プロジェクト レクチャーシリーズ第三回, “造血幹細胞を維持するニッチ(niche)とケモカイン CXCL12”(2010.1.19. 神戸)

# 生体組織工学研究部門

## 生体分子設計学分野 Department of Cellular Differentiation

分野主任 教授 開 祐司

*Prof. Yuji Hiraki*

### 【研究概要】

本研究分野では、組織血管化、軟骨・腱・靱帯形成とその再生修復の分子機構の解明を主たるテーマとして、動物モデル、細胞培養系を駆使して分子レベルでの解析を行っている。現在の研究テーマは、以下の通りである。

#### 1. Chondromodulin-I に関する研究

##### (1) 血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) の血管内皮細胞に対する作用に関する研究

我々は、ウシ胎仔骨端軟骨から血管新生抑制因子 ChM-I を精製・クローニングした。ChM-I は主に軟骨や心臓弁などの無血管に保たれる間葉組織に特異的に発現し、血管内皮細胞の遊走・増殖・管腔形成阻害活性を示す。さらに、ChM-I ノックアウトマウスの解析では、加齢に伴い心臓弁に異常な血管化が惹起されることから、ChM-I が組織の無血管性の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、血管内皮細胞に対する ChM-I の作用機序については十分に解析されていない。そこで、組換えヒト ChM-I タンパク質 (rhChM-I) を調製し、ChM-I によって誘導される最も初期の血管新生抑制応答である細胞遊走の阻害作用について詳細に検討した。rhChM-I は Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) のみならず、Fibroblast Growth Factor-2 や Insulin-like Growth Factor-I など種々の遊走刺激へのヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) のケモタキシスを阻害した。rhChM-I 存在下では VEGF-A 刺激に伴う HUVECs のアクチン細胞骨格および接着斑の再構成は著明に阻害され、Rac1 およびアクチン脱重合因子 cofilin の活性制御に異常が認められた。これらの結果を支持するように、タイムラプスにより HUVECs の細胞運動を観察すると、rhChM-I 処理細胞では、VEGF-A によって誘導される持続的な葉状仮足の形成が阻害され、一過性の仮足形成が高頻度に認められて、細胞の移動速度、定方向性が顕著に低下していた。以上の結果より、ChM-I は刺激依存的なアクチン細胞骨格の再構成を阻害することにより葉状仮足の伸長を不安定化して、細胞の運動性を抑制することが明らかとなった。このような遊走阻害作用は、線維芽細胞などに対してはほとんど認められず種々の血管内皮細胞において選択的に認められたことから、ChM-I の作用は血管内皮細胞に対する特異な作用機序を介していると考えられた。

##### (2) ChM-I の活性ドメイン構造に関する研究

ChM-I は 120 アミノ酸から成る糖タンパク質で、N 型糖鎖結合部位を含む N 末端側の親水性ドメイン (ドメイン 1) と、C 末端側にある疎水性のシステインリッチドメイン (ドメイン 2) から構成されている。我々はこれまでに CHO 細胞や 293-F 細胞などの哺乳細胞発現系を用いて糖鎖修飾されているヒト組換え ChM-I タンパク質 (G-hChM-I) を発現し、軟骨細胞および血管内皮細胞に対する生物活性を明らかにしてきた。一方、大腸菌 *E. coli* を用いてヒト組換え ChM-I タンパク質を発現させると、糖鎖修飾を欠いた ChM-I (NG-hChM-I) を得ることができる。



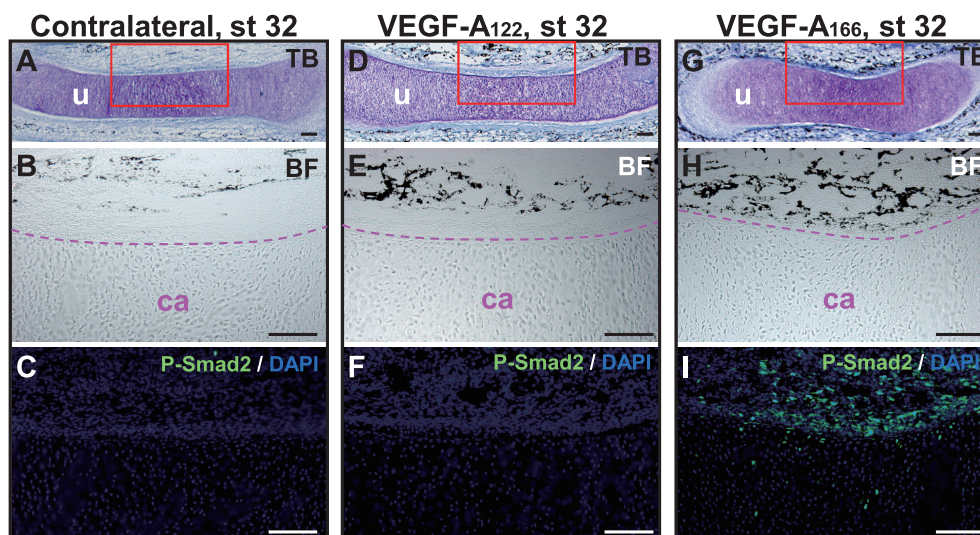
G-hChM-I と同様に、NG-hChM-I は弱いながら軟骨細胞のコロニー形成促進作用および血管内皮細胞の管腔形成阻害作用を示した。この活性は V8 プロテアーゼによる限定分解によって糖鎖修飾部位を含むドメイン 1 の一部を欠失させた  $\Delta$ N-hChM-I においてもほとんど変わらないことから、ドメイン 2 が ChM-I の活性ドメインであることが示唆された。これらのタンパク質の CD スペクトルを測定し、二次構造を解析した結果、ドメイン 1 内の糖鎖修飾はタンパク質の溶解性だけでなく、ChM-I が活性なドメイン構造を獲得するのに必要な機能ドメインであることが明らかとなった。現在、変異体タンパク質および合成ペプチドを用いて活性ドメイン構造の解析を進めている。ChM-I は、関連遺伝子である Tenomodulin を除くと、これまでに知られている血管新生抑制因子とホモロジーを示さないことから、その活性ドメインは血管新生抑制活性を有する新たなペプチド薬として応用が期待される。

## 2. 軟骨前駆細胞に対するリゾリン脂質 LPA の作用に関する研究

リゾホスファチジン酸(LPA)とスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は G タンパク質共役型受容体を介して様々な細胞過程に作用する生理活性リゾリン脂質である。我々は、胎生 10.5 日、11.5 日目のマウス胚を用いて *in situ* hybridization を行い、LPA 受容体の一つである LPA<sub>1</sub> が軟骨性骨原基およびその周囲の間葉系細胞において強く発現していることを見出した。リゾリン脂質は細胞増殖、細胞移動、細胞形態などに広範な作用を有するが、軟骨形成における役割については十分に解明されていない。そこで、マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 の *in vitro* 軟骨モデルを用いて、前駆軟骨細胞に対する LPA の作用について検討した。ATDC5 細胞は LPA<sub>1</sub> 受容体をはじめ種々のリゾリン脂質受容体を発現し、LPA により細胞増殖・遊走・軟骨分化が促進された。なかでも細胞遊走に対する LPA の作用は強力で、これと一致するようにアクチンフィラメント・細胞接着斑の形成促進および RhoA の活性化が認められた。siRNA および阻害剤を用いた実験から、LPA による遊走促進作用は主に LPA<sub>1</sub>-Gi-PI3 キナーゼを介した作用であることが明らかとなった。一方、S1P は ATDC5 細胞の遊走に対して抑制的に作用した。以上の結果から、LPA は軟骨前駆細胞の活性化において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

## 3. 軟骨性骨原基の血管侵入障壁に関する研究

内軟骨性骨形成では、血管侵入を契機に、無血管の軟骨から骨・骨髄への置換が開始される。この軟骨への血管侵入は、時間的にも空間的にも極めて厳密に制御されているが、その分子機構には不明な点が多い。そこで、軟骨に発現している VEGF-A isoform をマウス及びニワトリ胚前肢に過剰発現させることによって血管新生を亢進させ、内軟骨性骨形成の進展に伴う軟骨の血管侵入抵抗性の変化を解析した。その結果、いずれの VEGF-A isoform を過剰発現させても、軟骨と軟骨膜を含む軟骨周囲組織は無血管に保たれていた。すなわち、内軟骨性骨形成の初期には、軟骨と軟骨周囲組織という 2 種類の異なった血管侵入障壁が存在することが明らかになった。しかしながら、骨髄の形成に続いて、heparin や neuropilin と相互作用する VEGF-A<sub>146</sub>、VEGF-A<sub>166</sub>、VEGF-A<sub>190</sub> を過剰発現している前肢では、早期に軟骨膜が血管化された。一旦、軟骨膜が血管化されると、骨髄では MMP9 陽性の破骨細胞が出現し、血管侵入部位では骨格系細胞で MMP9 や MMP13 の遺伝子発現を誘導する TGF- $\beta$  のシグナリングが活性化され、軟骨への血管侵入が誘導された。一方、heparin に結合しない VEGF-A<sub>122</sub> や neuropilin と相互作用する領域を欠失した VEGF-A<sub>166</sub> $\Delta$ E<sub>162</sub>-R<sub>166</sub> を過剰発現させても、早期の軟骨膜血管化や軟骨への血管侵入は観察されなかった。従って、軟骨への血管侵入に先立つ軟骨膜血管化では、無血管の軟骨周囲組織が VEGF-A の isoform 特異的な応答能を獲得し、血管侵入抵抗性を失うプロセスが存在することが明らかになった。



軟骨周囲組織への血管侵入に伴う TGF- $\beta$  シグナリングの活性化

Stage 15-16 のニワトリ胚の前肢芽に VEGF- $A_{122}$  又は VEGF- $A_{166}$  RCAS ベクターをエレクトロポレーションによって導入し過剰発現させ、stage 32 の前肢を解析した。各ニワトリ胚の卵黄静脈に墨を注入して血管網を可視化した後、過剰発現肢及びその対照肢から凍結切片を作成し、トルイジンブルー染色 (A,D,G) 及び P-Smad2 の蛍光免疫染色 (緑) (C,F,I) による解析を行った。墨が注入された血管は、炭素粒子の沈着により、切片上において黒い点の集合として検出される (A,B,D,E,G,H)。パネル A,D, 及び G の四角で囲まれた部分に相当する領域を、それぞれパネル B-C, E-F, 及び H-I に示す。P-Smad2 を検出した切片は、パネル B, E, 及び H に明視野 (BF, bright field) を、パネル C,F, 及び I に蛍光像を示す。尺骨の軟骨組織の位置を破線で示す。Stage 32 において、対照肢 (A) 及び VEGF- $A_{122}$  過剰発現肢 (D) では、軟骨周囲組織への血管侵入は認められないが、VEGF- $A_{166}$  過剰発現肢 (G) では血管侵入が早期に誘導されている。P-Smad2 は、対照肢 (C) 及び VEGF- $A_{122}$  過剰発現肢 (F) では検出されないが、VEGF- $A_{166}$  過剰発現肢 (I) では、軟骨周囲組織及び軟骨組織の細胞において検出される。目盛尺は 100  $\mu$ m を示す。u, ulna (尺骨); ca, cartilage; TB, toluidine blue (トルイジンブルー)

#### Activation of TGF- $\beta$ signaling during vascular invasion into perichondrial tissue.

Semi-serial sections were prepared for toluidine blue staining (A, D, G) and immunostaining with anti-phospho-Smad2 (P-Smad2) (C, F, I). In A, B, D, E, G, and H, the locations of the vasculature are highlighted by the black dots, which represent colloidal carbon deposits. At stage 32, perichondrial angiogenesis in the ulna is not observed in the left contralateral (A) and right VEGF- $A_{122}$ -overexpressing forelimb (D) but seen in the VEGF- $A_{166}$ -overexpressing forelimb (G). Magnified images corresponding to the boxed regions in A, D, and G are shown as bright (B, E, H) or fluorescence images (C, F, I). Many P-Smad2 positive cells are detected in the vascularized perichondrial tissue and cartilage in the VEGF- $A_{166}$ -overexpressing forelimb (H, I), whereas P-Smad2 positive cells are absent in the contralateral (B, C) or VEGF- $A_{122}$ -overexpressing forelimb (E, F). u, ulna; ca, cartilage; BF, bright field; TB, toluidine blue. Scale bars, 100  $\mu$ m.

The proper growth and differentiation signaling from the surrounding extracellular environment regulates tissue formation and its functions. We are aiming at the elucidation of molecular interactions and signaling networks underlying vascularization of mesenchymal tissues and formation of skeletal tissues such as cartilage, bone and tendon/ligaments. Our current research efforts are focused on the following studies.

### 1. Functional analysis of Chondromodulin-I (ChM-I)

#### (1) The inhibitory actions of ChM-I on the motility of vascular endothelial cells

We have previously purified and cloned ChM-I as an angiogenesis inhibitor from fetal bovine cartilage based on the growth inhibitory activity of vascular endothelial cells (ECs). ChM-I is expressed in the avascular zones of cartilaginous molds and cardiac valves, and has been shown to inhibit the migration, proliferation, and tube morphogenesis of cultured ECs. The aged mice lacking ChM-I exhibit abnormal angiogenesis in cardiac valves, suggesting the essential role of ChM-I in maintaining the tissue avascularity. Despite these evidences showing the activity of ChM-I *in vivo* and *in vitro*, the molecular mechanism of the ChM-I actions remains to be elucidated. To address this issue, we have prepared recombinant human ChM-I (rhChM-I) and examined its effects on migration of

ECs, an early regulatory step in angiogenesis. In a modified Boyden chamber assay, ChM-I inhibited the chemotactic migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) as well as by Fibroblast Growth Factor-2 and Insulin-like Growth Factor-I. The inhibitory action involved the disturbed reorganization of actin cytoskeleton and focal adhesions in VEGF-A-stimulated ECs. We found that rhChM-I suppressed the VEGF-A-induced activation of Rac1 and the phosphorylation of cofilin, which leads to the dysregulation of actin polymerization. Consistent with these observations, time-lapse microscopic analysis revealed that ChM-I inhibited the persistent extensions of lamellipodia and evoked frequent alterations of moving front, coincident with the reduced motility and directionality of ECs upon VEGF-A stimulation. These data showed that ChM-I impaired the VEGF-A-stimulated motility of ECs through the destabilization of lamellipodial extensions. The inhibitory action was selective to the endothelial cell type, but not to the other cell types such as fibroblastic cells, suggesting that ChM-I acts through a endothelial cell-specific signal pathway that regulates the motility of ECs.

## (2) The analysis of domain structure of ChM-I

ChM-I (120 amino acids in human and mouse) is a glycoprotein consisting of the N-terminal hydrophilic domain with an N-glycosylation site (domain 1), and a hydrophobic cysteine-rich domain located at the C-terminus (domain 2). Domain 2 is well conserved across species and is highly similar to the C-terminal cysteine-rich domain of Tenomodulin (Tnmd), a ChM-I related angiogenesis inhibitor. Using a glycosylated form of recombinant human ChM-I (G-hChM-I) expressed in CHO cells or 293-F cells, we have demonstrated the various bioactivities of ChM-I on chondrocytes and vascular endothelial cells. On the other hand, the non-glycosylated form of human ChM-I expressed in *E. coli* (NG-hChM-I) exhibited the similar bioactivity, but the activity was distinctly lower than that of G-hChM-I. Truncation of the domain 1 containing the N-glycosylation site by limited digestion with V8 protease had no apparent effect on the bioactivity of NG-hChM-I, indicating that domain 2 is an active domain of this protein. Circular dichroism (CD) measurements revealed that N-glycosylation in domain 1 is critical for the structural integrity for biological function as well as the protein solubility. Current works focus on the analysis of active domain of ChM-I using its mutant proteins and synthetic peptides. So far, no sequence and structural similarity of ChM-I and Tnmd to any known angiogenesis inhibitor has been reported. Thus, the active domain of ChM-I is expected to be a novel anti-angiogenic peptide drug with promising activity for the angiogenesis-related diseases including solid tumors and rheumatoid arthritis.

## 2. Analysis of the actions of lysophospholipid LPA on the chondrogenic cell line ATDC5

Lysophosphatidic acid (LPA) and sphingosine-1-phosphate (S1P) are bioactive lysophospholipids that affect various cellular processes through G protein-coupled receptors. We found by in situ hybridization that E10.5 and 11.5 mouse embryos strongly expressed the LPA receptor subtype LPA<sub>1</sub> in cartilaginous bone primordia and the surrounding mesenchymal cells. However, despite the wide-ranging actions, the roles of lysophospholipids in chondrogenesis remains poorly understood. Using the mouse clonal cell line ATDC5 as an *in vitro* chondrogenesis model system, we examined the actions of LPA on the chondroprogenitor cells. Undifferentiated and differentiated ATDC5 cells expressed LPA<sub>1</sub> and other lysophospholipid receptors including S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>2</sub>. LPA stimulated the migration, proliferation, and chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. Stimulatory action of LPA on the migra-

tion of cells was so potent and accompanied the increase in the number of actin filaments and focal adhesions, concurrent with the activation of RhoA. SiRNA-mediated knockdown experiments and treatment with chemical inhibitors revealed that LPA stimulated the migration of ATDC5 cells via the LPA<sub>1</sub>-Gi-PI3 kinase. On the other hand, S1P had inhibitory effect on the migration of ATDC5 cells. These results indicate that LPA plays an important role in the activation of chondroprogenitor cells.

### 3. Analysis of the anti-angiogenic property of the cartilaginous bone primordia during endochondral bone formation

During endochondral bone formation, vascular invasion initiates the replacement of avascular cartilage by well-vascularized bone and bone marrow. Vascular invasion into the cartilaginous bone primordium occurs in a strictly spatio-temporally defined manner, but the molecular mechanism for this process is still poorly understood. By utilizing a VEGF-A mediated gain-of-function approach in mouse and chick models, we investigated the cellular and molecular events associated with angiogenic switching during endochondral bone formation. Cartilage-specific overexpression of VEGF-A<sub>164</sub> in transgenic mice results in the hypervascularization of soft connective tissues away from cartilage. Unexpectedly, perichondrial tissue remained avascular in addition to cartilage. Hypervascularization of soft tissues similarly occurred when various VEGF-A splicing variants (VEGF-A<sub>122</sub>, VEGF-A<sub>146</sub>, VEGF-A<sub>166</sub>, VEGF-A<sub>190</sub>) were overexpressed in the chick forelimb, but perichondrial tissue and cartilage were completely devoid of blood vessels. However, following formation of the bony collar in the middle of cartilaginous bone primordia, anti-angiogenic properties in perichondrial tissue were lost and perichondrial angiogenesis was accelerated by VEGF-A<sub>146</sub>, VEGF-A<sub>166</sub>, or VEGF-A<sub>190</sub>. Once the perichondrium was vascularized, osteoclast precursors were recruited from the circulation to the bony collar to differentiate into MMP9 positive osteoclasts and then the induction of MMP9 and MMP13 was observed in association with the activation of TGF- $\beta$  signaling. Neither perichondrial angiogenesis nor the subsequent cartilage vascularization was accelerated by the non-heparin-binding VEGF-A<sub>122</sub> or by the VEGF-A<sub>166</sub> $\Delta$ E<sub>162</sub>-R<sub>166</sub> lacking a neuropilin-binding motif. Thus, perichondrial angiogenesis is a prerequisite event for the subsequent vascular invasion into cartilage and is differentially regulated by VEGF-A isoforms.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Furumatsu, T., Shukunami, C., Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., and Ozaki, T.: Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* **42**(1): 148-156(2010)
- Miura, S., Mitsui, K., Heishi, T., Shukunami, C., Sekiguchi, K., Kondo, J., Sato, Y., Hiraki, Y.: Impairment of VEGF-A-stimulated lamellipodial extensions and motility of vascular endothelial cells by Chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitor. *Exp. Cell Res.* **316**(5): 775-788(2010)
- Yukata, K., Matsui, Y., Shukunami, C., Takimoto, A., Hirohashi, N., Ohtani, O., Kimura, T., Hiraki, Y., and Yasui, N.: Differential expression of Tenomodulin and Chondromodulin-1 at the insertion site of the tendon reflects a phenotypic transition of the resident cells. *Tissue and Cell* **42**: 116-120(2010)

- Hakuno, D., Kimura, N., Yoshioka, M., Mukai, M., Kimura, T., Okada, Y., Yozu, R., Shukunami, C., Hiraki, Y., Kudo, A., Ogawa, S., Fukuda, K.: Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production. *J. Clin. Invest.* **120**(7): 2292-2306 (2010)
- Itoh, R., Miura, S., Kondo, S., Sano, H., and Hiraki, Y.: Stimulatory actions of lysophosphatidic acid on mouse ATDC 5 chondroprogenitor cells. *J. Bone Miner. Metab.* **28**(6): 659-671 (2010)
- Kondo, J., Shibata, H., Miura, S., Yamakawa, A., Sato, K., Higuchi, Y., Shukunami, C., and Hiraki, Y.: A functional role of the glycosylated N-terminal domain of chondromodulin-I. *J. Bone Miner. Metab.* **29**(1): 23-30 (2011)
- 開 祐司:「私達は科学革命の終焉に遭遇しているのかも知れない」文部科学省高度化推進事業 オープン・リサーチ・センター整備事業 2009 年度 報告書「仏教生命観に基づく人間科学の総合研究」龍谷大学 pp. 149-158 (2010)
- 

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

- Yukata, K., Matsui, Y., Shukunami, C., Nakamichi, Y., Hiraki, Y., and Yasui, N.: Expression and role of chondromodulin-I in distraction osteogenesis. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (2010.3.6-9. Louisiana)
- 杉本由紀, 滝本 晶, Ralf Kist, Gerd Scherer, 開 祐司, 宿南知佐: 腱・靱帯形成における Sox9 の役割. 第 5 回 Skeletal Research Meeting (2010.6.12. 京都)
- Sugimoto, Y., Masago, Y., Nagata, K., Hiraki, Y., and Shukunami, C.: The functional role of collagen fibrillogenesis in tendons during establishment of the musculoskeletal system. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (2010.6.20-23. Kyoto)
- 杉本由紀, 真砂有作, 永田和宏, 開 祐司, 宿南知佐: 運動器連結システムにおけるコラーゲン線維形成の役割. (The functional roles of collagen fibrillogenesis in tendons and muscle segregation.) 第 42 回日本結合組織学会学術大会・第 57 回マトリックス研究会大会合同学術集会－生命諸科学を結合する細胞外マトリックス－ (2010.8.19-20. 秋田)
- 杉本由紀, 真砂有作, 永田和宏, 開 祐司, 宿南知佐: 運動器の連結におけるコラーゲン線維形成の役割. 第 11 回運動器科学研究会 (2010.9.10-11. 軽井沢)
- 滝本 晶, 開 祐司, 宿南知佐: 間充織凝集による軟骨形成と血管侵入抵抗性の獲得. (Establishment of anti-angiogenic resistance during endochondral ossification.) 第 42 回日本結合組織学会学術大会・第 57 回マトリックス研究会大会合同学術集会－生命諸科学を結合する細胞外マトリックス－ (2010.8.19-20. 秋田)
- 滝本 晶, 開 祐司, 宿南知佐: 軟骨形成における血管侵入抵抗性の獲得. 第 11 回運動器科学研究会 (2010.9.10-11. 軽井沢)

#### 2) 講演・シンポジウム

- 開 祐司: 間葉組織の血管化制御－血管侵入バリアーの形成－. がん特定研究 5 領域合同シンポジウム (2010.1.14-15. 東京)



宿南知佐：内軟骨性骨形成の進展における血管侵入バリアーの役割. 第9回松本ボーンフォーラム特別講演  
(2010.5.21. 松本)

宿南知佐：内軟骨性骨形成を制御する軟骨の血管侵入抵抗性. 第31回日本炎症・再生医学会－炎症再生の分子病  
態と新たな治療標的－ミニシンポジウム6 骨免疫学と血管生物学の新展開(2010.8.6. 東京)

Sugimoto, Y., Masago, Y., Nagata, K., Hiraki, Y., and Shukunami, C.: Collagen fiber formation is required for segregation of tendon primordia into individual tendons and subdivision of muscle masses. Kyoto University  
Global COE “Center for Frontier Medicine” International Symposium / Retreat 2010(2010.11.5-6 Awaji)

## 生体材料学分野 Department of Biomaterials

分野主任 教授 田畑 泰彦  
Prof. Yasuhiko Tabata

### 【研究概要】

本研究分野の目的は、医療に応用可能あるいは基礎生物医学研究に役立つ方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体材料とは、体内で使用したり、あるいはタンパク質、細胞などの生体成分と直接に接触する状況で用いられる材料のことであり、本研究分野においては、高分子、金属、セラミックス、およびそれらのコンポジットからなる生体材料のデザインと創製を行い、得られた生体材料の基礎生物医学および医療への応用を目指している。具体的には、生体組織・臓器の再生誘導治療(一般には、再生医療と呼ばれている)および再建外科治療に用いられる医用材料、人工臓器のための生体材料、あるいは薬物・遺伝子治療、予防ワクチン、および診断(分子イメージング)効率の向上を目指したドラッグデリバリーシステム(DDS)のための生体材料の研究開発を行っている。加えて、幹細胞の分子生物学、生化学、細胞生物学の研究、および細胞培養のために必要不可欠な生体材料についての研究開発も進めている。

再建外科治療をアシストする生体材料の生体適合性はまだまだ低く、その代行できる生物機能も単一であることから、臨床上、患者に高い Quality of Life(QOL)を与えることが困難である場合が多い。また、臓器移植もドナー不足に加えて、免疫拒絶抑制剤の副作用にともなう問題もある。このように、再建外科と臓器移植との現在の2大先端外科治療に限界が見えてきている状況の中で生まれてきたのが、細胞の増殖・分化能を活用、生体本来のもつ自然治癒力を介して、生体組織の再生修復によって病気を治療しようという試みである。この再生誘導治療の試みが医療応用できるようになれば、再建外科と臓器移植治療に続く第3の治療法となることは疑いない。この再生誘導治療は生体材料に依存しない点、免疫抑制剤を必要としない点で、前述の2大治療法とは大きく異なる。再生誘導治療の目的は、細胞の増殖分化能力を利用した生体組織の再生誘導と臓器機能の代替による病気の治療である。この実現には、再生現象にかかわる増殖・分化ポテンシャルの高い(幹)細胞とその周辺環境の基礎生物医学研究が必要であることはいうまでもないが、それに加えて、細胞の増殖、分化を促し、生体組織の再生を誘導するための環境(場)を与えることが不可欠である。別な言い方をすれば、再生誘導治療とは、細胞やその周辺環境をうまく設定することによって、本来、体のもっている自然治癒力を高めて、病気の治療を行うという、体にやさしい理想的な治療法である。この生体組織(Tissue)の再生誘導の場を構築するための医工学(Engineering)的な技術・方法論が生体組織工学(Tissue Engineering)である。

生体組織工学の基本アイデアは、生体組織の構成成分である細胞、細胞の増殖・分化のための足場、および生体シグナル因子(細胞増殖因子と遺伝子)をうまく組み合わせることで、生体組織の再生誘導を実現することである。このためには生体材料の利用が必要不可欠であり、特に、体内で分解吸収され消失する材料(生体吸収性材料)と3つの要素とを組み合わせ、生体組織の再生を誘導する。この再生誘導に適切な生体吸収性を金属やセラミックスにもたせることは難しく、この観点から、生体組織工学では主として高分子材料が利用されている。生体吸収性材料の利点は、材料の体内での役割が果たされた後に、その場から消失するため、再び取り除く必要がなく、また、材料が吸収されるために、材料が生体組織・臓器の再生過程を妨げないことである。生体材料が生体

組織の再生修復とともに吸収されれば、材料に対する問題となる生体反応の心配もなく、また、細胞を患者自身から採取することができれば、免疫拒絶反応もなく、理想的な治療法となる。DDS(ドラッグデリバリーシステム、薬物送達法)および生物医学研究のための材料にも生体吸収性が要求される場合が多い。

本研究分野では、生体吸収性の高分子材料を中心とした生体組織・臓器の再生誘導治療のための生体材料、薬物、遺伝子治療、予防、診断、などに必要な DDS のための生体材料、分子生物学、生化学、細胞生物学、細胞培養、および幹細胞研究のための生体材料、あるいは外科および内科治療補助のための生体材料の研究を行っている。以下にその内容をより詳しく述べる。

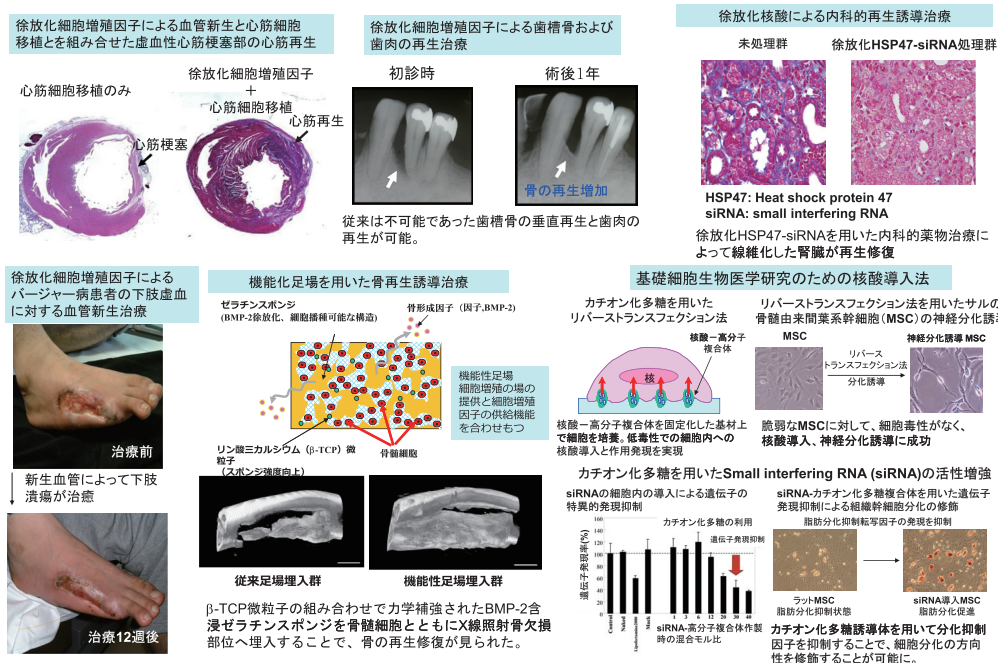
## 1) 生体組織の再生誘導治療のための生体材料

血液細胞以外のほとんどの細胞は、体内では細胞外マトリックス(タンパク質と多糖からなる3次元のハイドロゲル様構造体)と呼ばれる増殖・分化のための足場材料に接着して存在、その生物機能を発現している。そのため、生体組織が大きく欠損した場合には、この足場も失われるため、欠損部に細胞のみを補うだけでは生体組織の再生誘導を望めない場合が多い。そこで、再生誘導を期待する部位に細胞の増殖・分化を促すための仮の足場を与える必要がある。本研究分野では、この細胞の足場としての3次元あるいは多孔質構造をもつ生体吸収性の成形体(人工細胞外マトリックス)をデザイン、創製している。しかしながら、いかに足場が優れていても、細胞の数が少なかったり、細胞を増殖させるための生体シグナル因子が足りなければ、生体組織の再生誘導は望めないであろう。このような場合、細胞の増殖・分化を促す細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を用いるのが1つの現実的な解決法である。しかしながら、これらの生体シグナル因子は体内での寿命が短く不安定であるため、その利用には投与上の工夫が必要である。この工夫が DDS である。たとえば、生体吸収性材料に細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を包含させ、再生部位で徐々に放出(徐放)する。この徐放化技術によって、生体シグナル因子の生物活性が効率よく発揮され、その結果として、種々の生体組織・臓器の再生誘導が促進されることがわかってきている。現在、この細胞増殖因子の徐放化技術を利用した血管、骨、歯周組織などの再生誘導治療の臨床研究が始まっている。本研究分野では、この徐放化担体のための生体材料をデザイン、創製している。

一般に、拡張型心筋症、慢性腎炎、肝硬変、肺線維症など慢性疾患では、病的部位が線維性組織で占められ、臓器機能が不全に陥っていることが多い。そこで、内科的な薬物、遺伝子治療によって、この線維性組織を消化分解することができれば、周辺の正常組織の再生誘導能によって病的部位は再生修復され、慢性線維性疾患の内科的な再生誘導治療が実現できる。本研究分野では、このアイデアを基に病的部位への薬物・遺伝子のターゲティングおよび局所徐放化による難治性慢性線維性疾患に対する内科的再生誘導治療を行っている。この再生誘導治療の概念は、体のもつ再生誘導能力を活用するという点で、上述の足場や DDS 技術を用いた外科的再生誘導治療と同じであり、今後は外科治療だけではなく、内科治療に対しても、重要となっていくと考えられる。特に、難治性慢性疾患の悪化進行抑制は実現性の高い治療法である。

## 2) 幹細胞工学および基礎生物医学研究のための生体材料

再生誘導治療には、2つのアプローチがある。1つは前述の生体組織工学をベースとした生体組織の再生誘導治療である。もう1つが、増殖・分化ポテンシャルの高い幹細胞を利用する細胞移植治療である。後者のためには、臨床応用可能な十分な数と質のそろった細胞を調製することが重要となる。本研究分野では、この細胞移植治療に不可欠である幹細胞、前駆細胞、および芽細胞などを効率よく得ることを目的として、それらの細胞の単離、増殖、分化のための培養基材および培養技術について研究開発を行っている。従来の細胞培養法に加えて、種々の生体材



料からなる培養基材あるいは培養装置(バイオリアクタ)の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、単に再生誘導治療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけでなく、広く、細胞の増殖・分化、形態形成に関する生物医学の基礎研究にも応用できる生体材料、技術、方法論を提供することも大きな目的である。この技術は細胞を用いた薬の代謝、毒性を評価する創薬研究にも応用できる。加えて、細胞機能の解析および細胞の遺伝子改変を目的として、遺伝子導入、発現のための非ウイルスキャリアーのデザインと創製を行っている。これらの細胞に対する生体材料技術は、前項1)の治療の目的にも利用できる。

幹細胞を利用した細胞移植治療では、時として、細胞の再生誘導能力不足が問題となる場合がある。これを解決する1つの方法として、遺伝子導入による幹細胞の活性化(遺伝子による機能改変)が有望であり、広く行われている。これまでに、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入が行われているが、ウイルスを用いていることから、その臨床応用はきわめて難しい。そこで、非ウイルスキャリアーを用いた幹細胞の生物機能の活性化法の研究開発が強く望まれている。この1つの成果として、遺伝子を幹細胞内で徐放化する技術を開発した。この技術を利用することによって、ウイルスと同程度あるいはそれよりも高いレベルの遺伝子発現が実現できた。さらに、遺伝子により活性化した幹細胞を用いることによって、より高い細胞移植治療効果が認められることがわかった。また、遺伝子と非ウイルスキャリアーとが固定化された基材上で細胞を培養、さらにバイオリアクタを組み合わせることによって、細胞への遺伝子導入発現効率を高める(SubFection: substrate-mediated transfection)技術も開発した。非ウイルス性キャリアーを用いて、プラスミドDNAやsiRNAを細胞内に効率よく取り込ませ、細胞の生物機能や分化を制御することも可能となっている。これらの一連の物質導入技術は、細胞の生物機能の改変に有用であり、その対象となる物質は遺伝子だけでなく、small interfering RNA (siRNA)などの核酸物質、低分子、ペプチド、タンパク質などの細胞内導入法としても利用可能である。

### 3) ドラッグデリバリーシステム(DDS)のための生体材料

薬物が効くのは、薬物がその作用部位に適切に作用するからである。しかしながら、現実には、薬物は部位選択性がなく、その薬理作用を発現させるために大量投与が行われている。これが薬物の副作用の主な原因となっている。そこで、薬物を必要な部位へ、必要な濃度で、必要な時期にだけ働かせるための試みが行われている。これが

DDSである。DDSの目的は、薬物の徐放化、薬物の長寿命化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲッティングなどである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、生体材料学の観点からの治療薬物と治療遺伝子のためのDDS研究を行っている。

これまでの研究の経緯から、DDSの対象薬物は治療薬に集中していた。DDSの基本アイデアは、生物活性をもつ物質を全て薬物と考え、これらの物質と生体材料とを組み合わせることで、物質の生物活性を高めることである。つまり、DDSの対象となる薬物は、治療薬だけではなく、予防薬、診断薬、化粧品成分、ヘルスケア物質などを含んでいる。われわれは、このような基本アイデアからDDSを考え、これを実現するための材料、技術、方法論についての研究開発を進めている。例えば、全身あるいは局所粘膜ワクチン薬、および核磁気共鳴イメージング(MRI)、超音波診断薬などに対して、DDS技術を適用すれば、予防ワクチンおよび診断効果は高まる。また、化粧品、ヘルスケア成分へのDDS技術の適用は、それらの生物効果を高めることができる。このように、DDSとは、生物活性をもつ全ての物質に適用でき、自然科学領域において普遍的な技術である。生物作用をもつ物質の徐放化、可溶化、安定化、およびターゲッティングなどのDDS技術、方法論についても研究を進め、物質活性の増強を目指している。

#### 4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

本研究分野は、高分子、金属、セラミックス、およびそれらの複合材料を医療に応用していくという、本研究所の前身である生体医療工学研究センターの材料科学研究の流れを引いている。その中で、生体内で吸収する性質をもつ高分子材料を中心として、外科・内科治療の補助のための生体材料の研究開発を行っている。

上記の研究内容について、材料科学的な観点から、基礎および応用研究を行っている。得られた研究成果を基に、様々な生体組織、臓器(皮膚、骨、心臓冠動脈、脂肪、軟骨、神経、歯周組織、毛髪、心筋、腎臓など)の再生誘導のメカニズムの解明、その臨床応用、あるいはDDS技術、方法論を用いた薬物治療、予防、診断などについて、医学部、歯学部、獣医学部、企業との共同研究を通じた、応用研究を展開している。加えて、得られた材料や技術の生物医学の基礎研究への応用についても共同研究を通して検討を進めている。

The main objective of our department is to investigate and develop methods, procedures, and technologies which are applicable to basic and clinical medicines as well as basic researches of biology and medicine from the viewpoint of material sciences. The materials to use in the body and to contact biological substances, like proteins and cells, are defined as biomedical materials and biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials of polymers, metals, ceramics, and their composites, are being designed and created aiming at their clinical applications as well as the development of experimental tools necessary for basic researches of medicine and biology which scientifically support clinical medicine. We are actively proceeding research and development (R & D) of biomaterials to assist reconstructive surgery and apply to drug delivery systems (DDS) for improved therapeutic efficacy. However, it is often difficult for patients to improve their Quality of Life (QOL) only by the therapeutic procedure of reconstructive surgery because the biomaterials applied are of poor biocompatibility and functional substitutability. For organ transplantation, there are several problems to be resolved, such as the lack of donor tissue and organ or the adverse effects of immunosuppressive agents. The two advanced medical therapies currently available are clinically limited in terms of the therapeutic procedure and potential. In these circumstances, a new therapeutic trial, in which disease healing can be achieved based on the natu-

ral healing potential of patients themselves, has been increasingly expected. This is termed the therapy of regenerative medicine where the regeneration of tissues and organs is naturally induced to therapeutically treat diseases by artificially manipulating the cell potentials of proliferation and differentiation. The objective of regenerative therapy is to regenerate injured or lost tissues and substitute organ functions by making use of the cell potentials. The regenerative medical therapy is quite different from the reconstructive surgery and organ transplantation from the viewpoint that neither biomaterials and medical devices nor immunosuppressive agents are needed. The basic idea of regenerative therapy is to give cells a local environment which is suitable to promote their proliferation and differentiation, resulting in the cell-based induction of tissue and organ regeneration. It is tissue engineering that is a biomedical technology or methodology to create this environment for the natural induction of tissue regeneration. Generally, there are three factors necessary to induce tissue regeneration, such as cells, the scaffold for cell proliferation and differentiation, and biosignaling molecules of growth factors and the related gene, which are fundamentally 3 components constituting the body tissue. For successful regenerative therapy of tissue and organ, it is indispensable to efficiently combine various biomaterials with the body components. Among biomaterials, biodegradable biomaterials play an important role in this medical applications. Since there are few metals and ceramics with biodegradable nature, polymer materials of biodegradability are generally preferable for this purpose. The combination of polymers with metals or ceramics is effective in preparing material composites of suitable biodegradability. If a biomaterial is degraded to disappear in the body, it is not always necessary to retrieve the material from the body after the function expected is accomplished. In addition, the material should be degraded at the right time profile not to physically impair the natural process of tissue regeneration by the material remaining. Biodegradable biomaterials well-designed are indispensable for the research and development (R&D) of regenerative medical therapy, DDS or basic biology and medicine.

Our research goal is to design and create biomaterials from polymers and the composites with metals or ceramics which are practically applicable for regenerative medical therapy, stem cell technology, DDS, and medical therapy of reconstructive surgery and internal medicine. More detailed explanation about every project is described.

### **1) Biomaterials for the Therapy of Regenerative Medicine**

It is well recognized that cells are present in the living tissue interacting with the extracellular matrix (ECM) of natural scaffold for their proliferation, differentiation, and morphogenesis. When the body tissue is largely lost, the ECM itself also disappears. In such a case, only by supplying cells to the defect, we cannot always expect the tissue regeneration at the large defect. One of the possible ways to achieve successful tissue regeneration is to provide a temporary scaffold for the proliferation and differentiation of cells to the defect. We are designing and creating 3-dimensional and porous constructs of biodegradability as this temporary cell scaffold which is an artificial ECM. However, if the number of cells and the amount of biosignaling molecules are not large enough to promote the cell activities, only the supply of a scaffold to the tissue defect will not induce the tissue regeneration. As one trials to break through the situation, it practically possible to make use of growth factors for promoted proliferation and differentiation of cells. It is, however, necessary for in vivo use of growth factors to contrive their administration form because of the in vivo short half-life and instability. One possible answer for that is to use the controlled



release of growth factor or the related gene at the tissue site to be regenerated over an extended time period by incorporating the factor or gene into an appropriate carrier. This release technology enables the growth factor to efficiently enhance the biological activity, resulting in promoted cell-induced tissue regeneration. We are designing and preparing the biodegradable carrier of growth factors and genes from gelatin and its derivatives. A new therapy to naturally induce tissue and organ regeneration by the controlled release of various biologically active growth factors has been achieved and the therapeutic potentials have been scientifically demonstrated through animal experiments. Among the tissue regeneration trials, clinical experiments of angiogenic and bone regeneration therapies have been started by the controlled release technology of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor (IGF)-1, and platelet-rich plasma (PRP) to demonstrate the good therapeutic efficacy.

Generally, in the chronic fibrotic disease, such as dilated cardiomyopathy, liver cirrhosis, lung fibrosis, and chronic nephritis, the damaged portion of organ is often occupied with the fibrous tissue, which often causes organ dysfunction. It is highly possible that if the fibrosis is enzymatically digested by a proper way, the fibrotic site is naturally regenerated and repaired on the basis of the inherent regenerative potential of the surrounding normal tissue and consequently the organ function is regenerated and recovered. The systems of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity are being designed and prepared to achieve the regeneration therapy for chronic disease based on the natural healing potential of patients. Based on the drug administration therapy which has been clinically used in internal medicine, this is called as physical regenerative therapy of internal medicine. This is a therapeutic approach which is different from the conventional regenerative therapy of surgery where cells, the scaffold, and signal molecules or the combinations are surgically applied to a tissue defect for regeneration induction thereat. The two surgical and physical regenerative therapies are conceptually identical from the viewpoint of the positive use of natural healing potential. In addition, the basic idea of regenerative therapy will be combined with internal medical therapy to open a new therapeutic field in the future. For example, the combination with aneurysm catheter therapy has been tried, and consequently the aneurysm occlusion by the regenerated tissue-based organization has been succeeded by the bFGF release system. On the other hand, a new cell culture technology is being developed to enhance the cellular expression level of nucleic acid compounds, such as decoy DNA and small interfering RNA (siRNA), with non-viral gene carriers.

## **2) Biomaterials for Stem Cells Technology and Basic Researches of Medicine and Biology**

There are two approaches to realize regeneration medical therapy. One is the tissue engineering-based therapeutic approach described above. The other is the transplantation therapy of cells which have a potential to induce tissue regeneration. For the latter approach, it is of prime importance to efficiently obtain and prepare cells with a high potential of proliferation and differentiation, such as stem cells, precursors, and blastic cells. In this department, the technology and methodology of cell culture with various biomaterials and bioreactors have been explored to efficiently isolate, proliferate, and differentiate stem cells, precursors, and blastic cells. A series of this study not only aims at the preparation of cells suitable for the therapy of regenerative medicine, but also research and development (R&D) of materials, technologies, and methodologies for basic medicine and biology. They are also applicable for the research of drugs discovery to evaluate their metabolism and toxicity. In addition, non-viral vectors for plasmid DNA and siRNA have been investigated to design the DDS system for gene transfection which

can biologically analyze the functions of stem cells and genetically engineer cells to activate the biological functions for cell therapy. For example, a new system for the controlled release of plasmid DNA inside cells has been developed to succeed in enhancing the level of gene transfection and the consequent gene expression as high as or higher than that of viral vector system. In addition, a new technology of cell culturing on plasmid DNA-coated substrates has been designed and enhanced the level of gene expression as well as prolonged the expressed period. This reverse transfection system (SubFection : substrate-mediated transfection) was effective in the gene transfection for stem and matured cells which have not been readily transfected by the conventional method. This can be applied for the cell internalization of low-molecular weight compounds, peptides, proteins, and nucleic acids (siRNA and decoy DNA). We cannot only enhance the biological activities of plasmid DNA and siRNA with the non-viral vectors for stem cells, but also modify their biological functions and differentiation fate.

### 3) Biomaterials for DDS

Generally there are few drugs which have a specific selectivity for the site of action. Therefore, the high-dose administration of drugs is necessary to achieve their *in vivo* therapeutic efficacy, while this often causes the adverse effects of drugs. DDS is a biomaterial-technology which allows a drug to act at the right time the right site of action at the necessary concentration. The objective of DDS includes the controlled release of drug, the prolongation of drug life-time, the acceleration of drug permeation and absorption, and the drug targeting. Various biomaterials are inevitably required to achieve every DDS objective. In this department, various research projects of DDS for drug and gene therapies have been being carried out from the viewpoint of polymer material sciences. Our definition of “drug” is not limited only to therapeutic substances, but the drug includes every substance which has a certain biological activity and function, such as diagnostic and preventive drugs, cosmetics, and health care substances etc. The DDS technology and methodology can be also applied for preventive and diagnostic substances to enhance the *in vivo* efficacy of vaccination and diagnosis, such as magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound diagnosis or molecular imaging. We are developing DDS technology and methodology which are applicable to the research and development of cosmetics and health care sciences. The basic idea of DDS is to efficiently enhance the biological functions of a certain substance by the combination with biomaterials. DDS is defined as an universal technology or methodology which can apply to every research field of natural sciences.

### 4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

This department is partly originated from the division of Molecular Design and Biomaterials of the former Research Center for Biomedical Engineering where the medical applications of polymer materials have been investigated extensively. Among the research activities, we continue to molecularly design and create biomaterials mainly from biodegradable polymers aiming at the development of assistant materials in surgical and physical therapies.

From the viewpoint of biomaterial sciences, we are actively proceeding comprehensive biological and medical researches on the scaffold for the cell proliferation and differentiation, the DDS of growth factors and the related genes, and the material-based technology or methodology to use stem, precursor, and blast cells or in addition, their medical applications. Through several R&D collaborations with medical, dental, and veterinary schools as well as

private companies, we are planning to apply our basic research results to realize the regeneration induction therapy of various tissues and organs, such as the skin, fat, bone, cartilage, nerve, hair, blood vessels, periodontium, myocardium, and kidney. DDS technologies are also being investigated for their applications of therapeutic, prophylactic, and diagnostic medicines. Some biomaterials are necessary and applicable to further develop the basic researches of medicine and biology.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Asamura, S., Mochizuki, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y., Isogai, N.: Bone regeneration using a BMP-2-saturated slow-release gelatin hydrogel sheet: evaluation in a canine orbital floor fracture model. *Ann. Plast. Surg.* **64**(4): 496-502(2010)
- Nakagawa, T., Sakamoto, T., Hiraumi, H., Kikkawa, Y. S., Yamamoto, N., Hamaguchi, K., Ono, K., Yamamoto, M., Tabata, Y., Teramukai, S., Tanaka, S., Tada, H., Onodera, R., Yonezawa, A., Inui, K., Ito, J.: Topical insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial. *BMC Med.* **8**: 76(2010)
- Rabbany, Y.S., Pastore, J., Yamamoto, M., Miller, T., Rafii, S., Aras, R., Penn, M.: Continuous delivery of stromal cell-derived factor-1 from alginate scaffolds accelerates wound healing. *Cell Transplant.* **19**(4): 399-408(2010)
- Yamamoto, M., Yanase, K., Tabata, Y.: Generation of Type I Collagen Gradient in Polyacrylamide Hydrogels by a Simple Diffusion-Controlled Hydrolysis of Amide Groups. *Materials* **3**(4): 2393-2404(2010)
- Yamamoto, M., James, D., Li, H., Butler, J., Rafii S., Rabbany Y.S.: Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold, *Tissue Eng. Part A.* **16**(1): 299-308(2010)
- Jo, J., Okazaki, A., Nagane, K., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Preparation of cationized polysaccharides as gene transfection carrier for bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed.* **21**: 185-204(2010)
- Jo, J., Nagane, K., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Effect of amine type on the expression of plasmid DNA by cationized dextran. *J Biomater Sci Polym Ed.* **21**: 225-236(2010)
- Yoshida, M., Jo, J., Tabata, Y.: Augmented anti-tumor effect of dendritic cells genetically engineered by interleukin-12 plasmid DNA. *J Biomater Sci Polym Ed.* **21**: 659-75(2010)
- Liu, J., Tabata, Y.: Photodynamic antitumor activity of fullerene modified with poly(ethylene glycol) with different molecular weights and terminal structures. *J Biomater Sciences Polym Eds,* **22**: 297-312
- Leeuwenburgh, S.C., Jo, J., Wang, H., Yamamoto, M., Jansen, J.A., Tabata, Y.: Mineralization, Biodegradation, and Drug Release Behavior of Gelatin/Apatite Composite Microspheres for Bone Regeneration. *Biomacromolecules* **11**: 2653-9(2010)
- Jo, J., Aoki, I., Tabata, Y.: Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells. *J. Control. Release.* **142**: 465-73(2010)
- Nagane, K., Jo, J., Tabata, Y.: Promoted adipogenesis of rat mesenchymal stem cells by transfection of small inter-

- fering RNA complexed with a cationized dextran. *Tissue Eng. Part A* **16**: 21-31 (2010)
- Origuchi, T., Jo, J., Hirano, Y., Tabata, Y.: Enhanced tumor imaging efficacy of 5-aminolevulinic acid complexed with iron oxide nanoparticles. *International Journal of Nanotechnology*, in press
- Kohara, H., Tajima, S., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Angiogenesis induced by controlled release of neuropeptide substance P. *Biomaterials*. **31**(33): 8617-8625 (2010)
- Uesugi, Y., Kawata, H., Jo, J., Saito, Y., Tabata, Y.: An ultrasound-responsive nano delivery system of tissue-type plasminogen activator for thrombolytic therapy. *J. Control. Release*. **147**: 269-277 (2010)
- Usuki, H., Uesugi, Y., Arima, J., Yamamoto, Y., Iwabuchi, M., Hatanaka, T.: Engineered transaminopeptidase, aminolysin-S for catalysis of peptide bond formation to give linear and cyclic dipeptides by one-pot reaction. *Chem Commun (Camb)* **46**: 580-582 (2010)
- Hatanaka, T., Usuki, H., Arima, J., Uesugi, Y., Yamamoto, Y., Kumagai, Y., Yamasato, A., Mukaihara, T.: Extracellular Production and Characterization of Two *Streptomyces* L.: -Asparaginases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* In press
- Ratanavaraporn, J., Kanokpanont, S., Tabata, Y., Damrongsakkul, S.: Modulation of in vitro attachment, proliferation and osteogenic differentiation of rat bone-marrow-derived stem cells using different molecular mass chitosans and their blends with gelatin. *J Biomater Sciences Polym Ed.* **21** (8-9): 979-96 (2010)
- Kabashima, K., Sakabe, J., Yoshiki, R., Tabata, Y., Kohno, K., Tokura, Y.: Involvement of Wnt Signaling in Dermal Fibroblasts. *Am J Pathol.* **176**: 721-32 (2010)
- Tobe, M., Obata, H., Suto, T., Yokoo, H., Nakazato, Y., Tabata, Y., Saito, S.: Long-term effect of sciatic nerve block with slow-release lidocaine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology*. **112**(6): 1473-81 (2010)
- Guo, X., Park, H., Young, S., Kretlow, J.D., van den Beucken, J. J., Baggett, L. S., Tabata, Y., Kasper, K., Mikos, A. G., Jansen, J.A.: Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Acta Biomaterialia*. **6**: 39-47 (2010)
- Guo, X., Liao, J., Park, H., Saraf, A., Raphael, R.M., Tabata, Y., Kasper, F. K., Mikos, A. G.: Effects of TGF- $\beta$ 3 and pre-culture period of osteogenic cells on the chondrogenic differentiation of rabbit marrow mesenchymal stem cells encapsulated in a bilayered hydrogel composite. *Acta Biomater.* **6**(8): 2920-31 (2010)
- Kimura, Y., Tabata, Y.: Controlled Release of Stromal Cell-Derived Factor-1 From Gelatin Hydrogels Enhances Angiogenesis. *J Biomater Sciences Polym Ed.* **21**(1): 37-51 (2010)
- Kimura, Y., Inamoto, T., Tabata, Y.: Adipose Tissue Formation in Collagen Scaffolds with Different Biodegradabilities. *J Biomater Sciences Polym Ed.* **21**(4): 463-76 (2010)
- Kimura, Y., Tsuji, W., Yamashiro, H., Toi, M., Inamoto, T., Tabata, Y.: In situ adipogenesis in fat tissue augmented by collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *J Tissue Eng Regen Med*, **4**(1): 55-61 (2010)
- Pimpha, N., Sunintaboon, P., Inphonlek, S., Tabata, Y.: Gene delivery efficacy of polyethyleneimine-introduced chitosan shell/poly(methyl methacrylate) core nanoparticles for rat mesenchymal stem cells. *J Biomater Sciences Polym Ed.* **21**(2): 205-23 (2010)
- Ogawa, T., Akazawa, T., Tabata, Y.: In Vitro proliferation and chondrogenic differentiation of rat bone marrow stem cells cultured with gelatin hydrogel microspheres for TGF- $\beta$ 1 release. *J Biomater Sciences Polym Ed.*

**21**(5): 609-621 (2010)

- Inuyama, Y., Kitamura, C., Nishihara, T., Morotomi, T., Nagayoshi, M., Tabata, Y., Matsuo, K., Chen, K. -K., Terashita, M.: Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res Part B*. **92**(1): 120-128(2010)
- Ichinohe, N., Nakano, T., Mitaka, T., Umakoshi, Y., and Tabata, Y.: Proliferation and osteogenic differentiation of rat bone-marrow stromal cells on bio-apatite with different crystalline facets. *J Biomed Mater Res Part A*. **93A**(2): 646-655(2010)
- Chandana, E.P.S., Maeda, Y., Ueda, A., Kiyonari, H., Oshima, N., Yamamoto, M., Kondo, S., Oh, J., Takahashi, R., Yoshida, Y., Kawashima, S., Alexander, D.B., Kitayama, H., Takahashi, C., Tabata, Y., Matsuzaki, T., Noda, M.: Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice. *BMC Der Biol*. **10**(1): 84(2010)
- Kuroda, Y., Akiyama, H., Kawanabe, K., Tabata, Y., Nakamura, T.: Treatment of experimental osteonecrosis of the hip in adult rabbits with a single local injection of recombinant human FGF-2 microspheres. *J Bone Miner Metab*. **28**(6): 608-16(2010)
- Ohta, S., Nitta, N., Sonoda, A., Seko, A., Tanaka, T., Takazakura, R., Furukawa, A., Takahashi, M., Sakamoto, T., Tabata, Y., Murata, K.: Embolization materials made of gelatin: comparison between Gelpart and gelatin microspheres. *Cardiovasc Intervent Radiol*. **33**(1): 120-6(2010)
- Sonoda, A., Nitta, N., Ohta, S., Nitta-Seko, A., Morikawa, S., Tabata, Y., Takahashi, M., Murata, K.: Controlled release and antitumor effect of pluronic F127 mixed with cisplatin in a rabbit model. *Cardiovasc Intervent Radiol*. **33**(1): 135-42(2010)
- Sonoda, A., Nitta, N., Nitta-Seko, A., Ohta, S., Takamatsu, S., Ikehata, Y., Nagano, I., Jo, J., Tabata, Y., Takahashi, M., Matsui, O., Murata, K.: Complex comprised of dextran magnetite and conjugated cisplatin exhibiting selective hyperthermic and controlled-release potential. *Int J Nanomedicine*. **9**(5): 499-504(2010)
- Mizusawa, K., Igarashi, R., Uehira, K., Takafuji, Y., Tabata, Y., Tochio, H., Shirakawa, M., Sando, S., Aoyama, Y.: Turn-on detection of targeted biochemical reactions by triple resonance NMR analysis using isotope-labeled probe. *Chem Lett*. **39**: 926-28(2010)
- Tanigo, T., Takaoka, R., Tabata, Y.: Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *J Control Release*. **143**: 201-6(2010)
- Hu, Y., Fu, Y., Tabata, Y., Gao, J.: Mesenchymal stem cells: A promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy. *J Control Release*. **147**: 154-62(2010)
- Nakamura, K., Tabata, Y.: A new fluorescent imaging of renal inflammation with RCP. *J Control Release*. **148**(3): 351-58(2010)
- Liu, J., Tabata, Y.: Photodynamic therapy of fullerene modified with pullulan on hepatoma cells. *J Drug Targe*. **18**(8): 602-10(2010)
- Wakao, S., Hayashi, T., Kitada, M., Kohama, M., Matsuse, D., Teramoto, N., Ose, T., Itokazu, Y., Koshino, K., Watabe, H., Iida, H., Takamoto, T., Tabata, Y., Dezawa, M.: Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. **223**(2): 537-47(2010)

- Kishimoto, Y., Hirano, S., Kitani, Y., Suehiro, A., Umeda, H., Tateya, I., Kanemaru, S., Tabata, Y., Ito, J.: Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor hydrogel. *Laryngoscope*. **120**(1): 108-13(2010)
- Gao J.Q, Zhao Q.Q, Lv T.F, Shuai W.P, Zhou J, Tang G.P, Liang W.Q, Tabata Y, Hu Y.L.: Gene-carried chitosan-linked-PEI induced high gene transfection efficiency with low toxicity and significant tumor-suppressive activity. *Int J Pharm*, **387**: 286-94(2010)
- Kinoshita, Y., Tamura, T., Yokoya, S., Matsuda, D., Kamata, Y., Yamaguchi, S., Nemoto, K., Hori, S., Deguchi, S., Tabata, Y.: Preliminary report on periodontal regeneration using gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor (bFGF). *Journal of Periodontal Research*. in press
- Watanabe, M., Jo, J., Radu, A., Kaneko, M., Tabata, Y., Flake, A.W.: A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele with gelatin sponges incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng Part A*. **16**(5): 1645-55(2010)
- Takahashi, R., Sonoda, H., Tabata, Y., Hisada, A.: Formation of hepatocyte spheroids with structural polarity and functional bile canaliculi using nanopillar sheets. *Tissue Eng Part A*. **16**(6): 1983-95(2010)
- Kato, H., Suga, H., Eto, H., Araki, J., Aoi, N., Doi, K., Iida, T., Tabata, Y., Yoshimura, K.: Reversible adipose tissue enlargement induced by external tissue suspension: possible contribution of basic fibroblast growth factor in the preservation of enlarged tissue. *Tissue Eng Part A*. **16**(6): 2019-40(2010)
- Ishida, K., Matsumoto, T., Sasaki, K., Mifune, Y., Tei, K., Kubo, S., Matsushita, T., Takayama, K., Akisue, T., Tabata, Y., Kurosaka, M., and Kuroda, R.: Bone regeneration properties of granulocyte colony-stimulating factor via neovascularization and osteogenesis. *Tissue Eng. Part A*. **16**(10): 3271-3284(2010)
- Fujiwara, H., Saiki, Y., Sato, M., Sakamoto, N., Ohashi, T., Sato, M., Tabata, Y., Tabayashi, K.: Modification of the descending thoracic aortic anastomotic site using biodegradable felt: Study in a canine model with or without basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg*. **51**: 194-202(2010)
- Horie, R., Sakamoto, T., Nakagawa, T., Tabata, Y., Okamura, N., Tomiyama, N., Tachibana, M., Ito, J.: Sustained delivery of lidocaine into the cochlea using poly lactic/glycolic acid microparticles. **120**(2): 277-83(2010)
- 田畑泰彦, 谷郷智美, 高岡良平: 低分子薬物の徐放化を目指した生体吸収性ハイドロゲルのデザインと調製. *日本化学繊維研究所講演集*. **67**: 95-107(2010)
- 山本雅哉, 林健太郎, 村上裕子, 稲生佳菜子, 田畑泰彦: 細胞培養基材としての高分子ハイドロゲルの作製. *ポパー学会記録*. **136**: 1-7(2010)
- 深田憲将, 内田一茂, 大宮美香, 松下光伸, 仲瀬裕志, 千葉勉, 田畑泰彦, 岡崎和一: 実験腸炎に対するシクロスポリン封入マイクロスフェアの治療. *消化器内科*. **51**(4): 336-340(2010)
- 瀬尾洋行, 佐々木直樹, 杉山仁志, 都築直, 西井知, 大塚健史, 山田明夫, 田畑泰彦.: basic Fibroblast Growth Factor 含浸ゼラチンハイドロゲルシートならびにバンコマイシン含有ポリ乳酸グルコール酸共重合体シートを用いた中足骨開放骨折の乳用子牛の1症例. *日本獣医師会雑誌*. **63**(6): 435-38(2010)

## 2) 著 書

- 田畑泰彦: 「再生医療」の期待に応えるために－異分野連携と産官学の協力体制の強化－. *再生医療*. **9**(4): 13-14(2010)
- 山本雅哉: 幹細胞の分化を制御するためのバイオマテリアル－二次元培養基材と三次元足場材料との比較－. *再生*

医療. **9**(4): 471(2010).

城 潤一郎, 田畑泰彦: アテロコラーゲンおよびゼラチンハイドロゲルを用いた動物への核酸導入, 「改訂第5版 新 遺伝子工学ハンドブック」(村松正實, 山本雅, 岡崎康司編, 羊土社, 東京)315-319(2010)

### 3) 総 説

Kohara, H., Tabata, Y.: Tissue engineering technology to enhance cells recruitment for regeneration therapy. J Med Biol Eng. **30**(5): 267-276(2010)

He, C. X., Tabata, Y., Gao, J. Q.: Non-viral gene delivery carrier and its three dimensional transfection system. Int J Pharm. **386**: 232-42(2010)

Chen, Y. Z., Yao, X. L., Nakagawa, S., Tabata, Y., Gao, J. Q.: Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immuno therapy. Clinical and Developmental Immunology. 2010: 565643(2010)

田畑泰彦: バイオマテリアル技術を利用した樹状細胞の体内癌免疫活性化. 実験医学. **28**(1): 60-62(2010)

田畑泰彦: 再生医療と幹細胞研究に必要な不可欠な次世代バイオマテリアル技術. 実験医学. **28**(2): 173-78(2010)

田畑泰彦: 第2章 臨時応用の取り組みにかかる事例 15. 再生医療(組織工学)ーバイオマテリアル技術からみた再生医療の臨床研究と応用. 遺伝子医学 MOOK 17号 事例に学ぶ. 実践, 臨床応用研究の進め方. 165-70(2010)

田畑泰彦: 再生誘導治療を実現するバイオマテリアル技術. ICU と CCU. **34**(5): 349-54(2010)

田畑泰彦: バイオマテリアル技術を用いた再生医療の最前線. 日本高気圧環境・潜水医学会関東地方会誌. **9**(2)in press

丸井晃, 田畑泰彦, 乾賢一, 柳茂樹, 坂田隆造: bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる下肢血管新生療法. 臨床評価刊行会. **38**(3): 513-19(2010)

田畑泰彦: 血管再生メカニズムと血管新生治療展開. International Review of Thrombosis. **5**(4) (2010)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

Yamamoto, M., Rabbany, Y.S., James, D., Li, H., Butler, J., Rafii, S.: Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold. 「第2回日本再生医療学会」(2010.3.18 広島)

山本雅哉, 林健太郎, 村上裕子, 稲生佳菜子, 田畑泰彦: 細胞培養基材としての高分子ハイドロゲルの設計. 「第136回ポータル会」(2010.7.3 京都)

山本雅哉, 村上祐子, 田畑泰彦: 軟らかさの異なる糖応答性ハイドロゲル上での上皮細胞の上皮間葉転換. 「第31回日本炎症・再生医学会」(2010.8.5 東京)

Toda, H., Yamamoto, M., Kohara, H., Tabata, Y.: Site-specific immobilization of jagged1 on glass substrates for ex vivo expansion of a bone marrow cell population containing hematopoietic stem cells. Nanobio2010(2010.8.23 Zurich)

Toda, H., Yamamoto, M., Kohara, H., Tabata, Y.: Fabrication of jagged1-immobilized substrates for the ex vivo expansion of a cell population containing hematopoietic stem cells. TERMIS-AP(2010.9.15 Sydney)



Yamamoto, M., Murakami, Y., Tabata, Y.: Morphological change of epithelial cells cultured on substrates with different stiffness. 2010 Annual Meeting of Biomedical Engineering Society (2010.10.6 Austin)

城 潤一郎, 劉健, 山本雅哉, 田畑泰彦: 骨再生過程評価のための多機能性高分子造影剤の作製. 第9回日本再生医療学会総会(2010.3.18-19 広島)

城 潤一郎, 劉健, 山本雅哉, 青木伊知男, 田畑泰彦: 多機能性高分子造影剤を用いた骨再生過程のイメージング. 第5回日本分子イメージング学会学術集会(2010.5.22-23 大津)

城 潤一郎, 田畑泰彦: 細胞機能の修飾のための DDS バイオマテリアル技術. 第26回日本 DDS 学会(2010.6.17-18 大阪)

Jo, J., Nagane, K., Kido, Y., and Tabata, Y.: Promoted adipogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells by transfection of small interfering RNA complexed with a cationized dextran. 37th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (2010.7.10-14 Oregon)

城 潤一郎, 木戸祐一郎, 永根健太郎, 田畑泰彦: スベルミン導入プルランを用いた small interfering RNA 導入による幹細胞分化の修飾. 第31回日本炎症・再生医学会(2010.8.5-6 東京)

城 潤一郎, 田畑泰彦: 多糖からなる核酸導入材料による細胞機能の修飾. 遺伝子・デリバリー研究会第10回夏期セミナー(2010.9.1-2 大津)

Jo, J., Morita, M., Minami, M., Yuasa, S., Yano, T., and Tabata, Y.: Enhanced photoacoustic imaging efficacy of indocyanine green by the complexation with lipid-introduced gelatin derivatives. 2010 World Molecular Imaging Congress (2010.9.8-11 Kyoto)

Jo, J., Liu, J., Yamamoto, M., and Tabata, Y.: Preparation of polymer-based multimodal imaging agent to visualize the process of bone regeneration. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2010 Asia Pacific Meeting (2010.9.15-17 Sydney)

城 潤一郎, 劉健, 河合裕子, 青木伊知男, 田中忠蔵, 山本雅哉, 田畑泰彦: 高分子からなる多機能性イメージング剤を用いた骨再生過程の可視化. 第32回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

小原洋志, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルを用いた神経ペプチド徐放システムによる血管新生誘導. 第39回医用高分子シンポジウム(2010.7.26-27 東京)

小原洋志, 田畑泰彦: 徐放化神経ペプチドによる血管新生の誘導. 第31回日本炎症・再生医学会(2010.8.5-6 東京)

Kohara, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: The controlled release of neuropeptide induces angiogenesis. Biomedical Engineering Society 2010 Annual Meeting. (2010.10.6-9 Austin)

小原洋志, 田畑泰彦: 徐放化 BMP-2 により動員される細胞の加齢変化. 第32回バイオマテリアル学会(2010.11.29-30 広島)

上杉佳子, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 超音波を利用した血栓溶解剤デリバリーシステムの開発. 日本薬学会第130年会(2010.3.28-30 岡山)

上杉佳子, 川田啓之, 城 潤一郎, 斎藤能彦, 田畑泰彦: 血栓症の治療を目的とした超音波ハイブリッドナノ DDS の開発. 第26回日本 DDS 学会(2010.6.17-18 大阪)

上杉佳子, 川田啓之, 城 潤一郎, 斎藤能彦, 田畑泰彦: 血栓症治療のための超音波応答型ナノ DDS の設計. 日本バイオマテリアル学会第5回関西若手研究発表会(2010.8.6 京都)

Uesugi, Y., Kawata, H., Jo, J., Saito, Y., Tabata, Y.: Molecular design of ultrasound-responsive delivery system for

- thrombolytic therapy. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society 2010 AP meeting (2010.9.15-17 Sydney)
- 上杉佳子, 川田啓之, 城 潤一郎, 斎藤能彦, 田畑泰彦: 超音波応答型ナノ DDS の血栓症治療への応用. 第 26 回日本 DDS 学会(2010.11.29-30 広島)
- 上杉佳子, 川田啓之, 城 潤一郎, 斎藤能彦, 田畑泰彦: 超音波応答型ナノ DDS の血栓症治療への応用. 再生医科学研究所若手研究交流会(2010.12.13 京都)
- 上杉佳子, 畑中唯史: 放線菌由来セリンプロテアーゼの血栓溶解に関わるアミノ残基. 第 83 回日本生化学会大会(2010.12.7-10 神戸)
- 松井 誠, 山本雅哉, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲル細粒からの PRP 徐放による血管新生. 第 32 回日本バイオマテリアル学会(2010.11.29-30 広島)
- Ratanavaraporn, J., Tabata, Y.: The combination of stromal cell-derived factor-1 and bone morphogenetic protein-2 for bone tissue engineering. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, Asia Pacific (TERMIS AP 2010) (2010.9.15-17 Australia)
- Ratanavaraporn, J., Furuya, H., Tabata, Y.: Synergistic effect of stromal cell-derived factor-1 and bone morphogenetic protein-2 released from gelatin hydrogels for in vivo bone regeneration. International Bone-Tissue-Engineering Congress (bone-tec 2010) (2010.10.7-10 Germany).
- Ratanavaraporn, J., Tabata, Y.: Enhanced bioactivity and osteoinductivity of bone morphogenetic protein-2 in mesenchymal stem cells by 2-O desulfated heparin. Japanese Society for Biomaterials (JSB 2010) (2010.11.29-30 Hiroshima)
- 宮澤敦子, 浅野一成, 松野智宣, 田畑泰彦, 佐藤田鶴子: ゼラチンハイドロゲルからのシンバスタチン徐放による第二象牙質の形成促進. 第 32 回バイオマテリアル学会大会(2010. 11. 29-30 広島)
- 根来宏光, 今村正明, 金谷 勲, 松岡亮介, 田中充士, 吉村耕治, 兼松明弘, 田畑泰彦, 小川 修: bFGF は膀胱平滑筋において ERK1/2 経路を介してコネキシン 43 の発現を増強することにより頻尿症状をもたらす. 第 98 回日本泌尿器科学会総会(2010.4.26-30 盛岡)
- 根来宏光, 兼松明弘, 杉野善雄, 沖波 武, 西川信之, 吉村耕治, 岡村 均, 田畑泰彦, 小川 修: Automated voided stain on paper (aVSOP)法は, マウスの日内排尿リズムの記録を可能とする. 第 17 回日本排尿機能学会(2010. 9.29-10.1 甲府)
- Hirai, K., Tabata, Y., Sakai, Y.: The effects of fibroblast growth factor with sustained release method on wound healing in intestinal anastomoses. 45<sup>th</sup> Annual Congress of the European Society for Surgical Research. (2010. 6. 19-12 Geneva)
- 平井健次郎: 腸管吻合部創傷治癒に対する徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子の効果. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 平井健次郎, 田畑泰彦, 坂井義治: 徐放化 bFGF スポンジを用いた腸管吻合部創傷治癒促進. 第 32 回日本バイオマテリアル学会(2010.11.29-30 広島)
- Hussain, A., Takahashi, K., Bessho, K., Tabata, Y.: 3 layer scaffold for the treatment of osteochondral defects. Japanese society of regenerative medicine(2011.03. Tokyo)
- 中村陽子: 塩基性線維芽細胞増殖因子とストロマ細胞由来因子の組み合わせ徐放化による血管新生. 日本バイオマテリアル学会(2010.11.29-30 広島)

古谷洋之, 金子和夫, 田畑泰彦: 徐放化 bFGF を利用した卵巣摘出マウスモデルでの骨再生. 第 32 回日本バイオマテリアル学会(2010.11.29-30 広島)

齊藤高志, 田畑泰彦: 低分子量ヘパリン徐放化ゼラチンハイドロゲルを用いた腹膜線維化の治療(2010.08.06 京都)

齊藤高志, 田畑泰彦: 抗線維化効果をもつ低分子量ヘパリン徐放化ゼラチンハイドロゲルの作製(2010.11.29-30 広島)

白井智明, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 組織ターゲティングのためのカチオン化ゼラチンによる siRNA 修飾. 第 9 回日本再生医療学会総会(2010.3.18-19 広島)

白井智明, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 炎症イメージングプローブの作製のための抗体修飾. 第 26 回日本 DDS 学会(2010.6.17-18 大阪)

白井智明, 城 潤一郎, 田畑泰彦: Drug Delivery System(DDS)化抗体による炎症イメージングの試み. 第 31 回日本炎症・再生医学会(2010.8.5-6 東京)

白井智明, 城 潤一郎, 田畑泰彦: Drug Delivery System(DDS)化抗体を用いた炎症イメージング. 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

田島脩平, 木戸祐一郎, 田畑泰彦: 細胞内遺伝子徐放のためのカチオン化ゼラチン/プラスミド DNA 複合体の作製. 第 26 回日本 DDS 学会(2010.6.17-18 大阪)

田島脩平, 木戸祐一郎, 田畑泰彦: 細胞内遺伝子徐放のためのカチオン化ゼラチン/プラスミド DNA 複合体の作製. 第 5 回日本バイオマテリアル学会関西若手研究会(2010.8.6 京都)

田島脩平, 田畑泰彦: 生体吸収性ゼラチン粒子を含んだ細胞集合体の作製. 第 32 回日本バイオマテリアル学会関西若手研究会(2010.11.29-30 広島)

戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 造血幹細胞培養を目指した Jagged1 固定化基材の作製. 第 9 回日本再生医療学会総会(2010.3.18-19 広島)

戸田裕之, 山本雅哉, 小原洋志, 田畑泰彦: 造血幹細胞増幅のための Jagged1 配向固定化基材の作製. 第 27 回日本炎症・再生医学会(2010.8.5-6 東京)

戸田裕之, 山本雅哉, 小原洋志, 田畑泰彦: 造血幹細胞増幅を目指した Jagged1 配向固定化基材の作製. 第 59 回高分子討論会(2010.9.15-17 北海道)

戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: アルカリホスファターゼにより硬さの変化するハイドロゲルの作製. 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

糸岡朝樹, 大野由尊, 山本雅哉, 田畑泰彦: アルギン酸スポンジ内での細胞増殖因子の濃度勾配の形成. 第 56 回高分子研究発表会(2010.7.16 神戸)

糸岡朝樹, 大野由尊, 山本雅哉, 田畑泰彦: アルギン酸スポンジ内での細胞増殖因子の濃度勾配の形成. 日本バイオマテリアル学会 第 5 回関西若手研究発表会(2010.8.6 京都)

糸岡朝樹, 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞増殖因子の濃度勾配をもつアルギン酸スポンジ内での細胞培養. 第 32 回日本バイオマテリアル学会(2010.11.29-30 広島)

稲生佳菜子, 山本雅哉, 田畑泰彦: 糖応答性をもつフェニルボロン酸導入ハイドロゲルの調製. 第 56 回高分子研究発表会(2010.7.16 兵庫)

稲生佳菜子, 山本雅哉, 田畑泰彦: 糖応答性をもつ生体吸収性ハイドロゲルの作製. 日本バイオマテリアル学会 第 5 回関西若手研究発表会(2010.8.6 京都)

稲生佳菜子, 山本雅哉, 田畑泰彦: 糖添加により水可溶化するゼラチンハイドロゲルの作製. 第 32 回日本バイオ

マテリアル学会(2010.11.29-30 広島)

柚本聡, 川端慎吾, 川上尚章, 田畑泰彦: 誘導体化プロネクチン F の細胞接着性と増殖特性. 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

川端慎吾, 浅野一成, 田畑泰彦: 細胞接着性因子プロネクチン F を利用したチタンの歯肉付着性の向上. 第 32 回バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

Inaoka, T., Nakagawa, T., Shintaku, H., Kawano, S., Wada, H., Hamanishi, S., Tabata, Y., Kumakawa, K., Naito, Y., Ito, J.: A new concept for hair cell regeneration: implantation of an Artificial Sensory Epithelium. 33<sup>rd</sup> ARO Midwinter Meeting(2010.2.6-10 Anaheim)

Inaoka, T., Nakagawa, T., Shintaku, H., Kawano, S., Wada, H., Hamanishi, S., Tabata, Y., Kumakawa, K., Naito, Y., Ito, J.: Development of Bionic Cochlear Epithelium. Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders(2010.11.14-17 Kyoto)

木村拓郎, 北川偉之, 宇山 浩, 田畑泰彦: 同軸ノズル電界紡糸法によるヘパリン徐放性不織布の開発. 第 59 回高分子学会年次大会(2010.5.26-28 横浜)

木村拓郎, 北川偉之, 宇山 浩, 田畑泰彦: 同軸ノズル電界紡糸法によるヘパリン徐放性不織布の開発. 平成 22 年度繊維学会年次大会(2010.6.16-18 東京)

木村拓郎, 北川偉之, 宇山 浩, 田畑泰彦: ドライスピニングによるファイバーからなる三次元構造体の作製と応用. 平成 22 年度繊維学会年次大会(2010.6.16-18 東京)

木村拓郎, 北川偉之, 宇山 浩, 田畑泰彦: 同軸ノズル電界紡糸法によるヘパリン徐放性不織布の開発. 第 39 回医用高分子シンポジウム(2010.7.26-27 東京)

木村拓郎, 北川偉之, 宇山 浩, 田畑泰彦: 同軸ノズル電界紡糸法によるヘパリン徐放性不織布の開発. 第 5 回日本バイオマテリアル学会関西若手研究会(2010.8.6 京都)

木村拓郎, 北川偉之, 宇山 浩, 田畑泰彦: 水溶性薬剤を内包した徐放性不織布の開発. 第 59 回高分子学会討論会(2010.9.15-17 北海道)

木村拓郎, 北川偉之, 宇山 浩, 田畑泰彦: 水溶性薬剤を内包した徐放性不織布の開発. 第 32 回バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

Kimura, T., Kitagawa, T., Uyama, H., and Tabata, Y.: Development of heparin controlled-releasing non-woven mats by coaxial electrospinning. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies(2010 .12.15-20 Hawaii)

吉川達也, 小原洋志, 田畑泰彦, 高橋 淳: パーキンソン病に対する GDNF 徐放化生体吸収性ハイドロゲル脳内移植の効果. 第 9 回日本再生医療学会(2010.3.19 広島)

吉増達也, 前部屋進自, 尾浦正二, 玉置剛司, 中村理恵, 平井慶充, 清井めぐみ, 宮坂美和子, 太田文典, 川後光正, 岡村吉隆, 村上裕子, 田畑泰彦: 難治性気胸に対する徐放性 basic-FGF 製剤胸腔内投与による再生医療の可能性. 第 110 回日本外科学会定期学術集会(2010.4.8-10 名古屋)

Yoshikawa, T., Kohara, H., Tabata, Y., and Takahashi, J.: Combined transplantation of fetal dopaminergic grafts and biodegradable gelatin hydrogel microspheres incorporating glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinsonian rats. Neuroscience 2010, 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience(2010.11.13-17 San Diego)

石田一成, 黒田良祐, 松本知之, 藤田周史, 佐々木謙, 鄭克真, 久保晴司, 松下雄彦, 田畑泰彦, 黒坂昌弘: 生体

吸収性ハイドロゲルを用いた顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の局所徐放投与による骨再生. 38 回骨・カルシウム代謝研究会(2010.2.5 京都)

Fukui T, Ii M, Mifune Y, Shoji T, Matsumoto T, Kawakami Y, Kuroda T, Kawamoto A, Tabata Y, Kurosaka M, Kuroda R, Asahara T. Therapeutic Effect of Local Administration of Low Dose Simvastatin Conjugated Gelatin Hydrogel for Fracture Healing. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society(2010. 3.7-10 New Orleans, USA)

Fukui T, Ii M, Mifune Y, Shoji T, Matsumoto T, Kawakami Y, Kuroda T, Akimaru H, Kawakami H, Jo J, Tabata Y, Kurosaka M, Kuroda R, Asahara T. Therapeutic Effect of Local Administration of Low Dose Simvastatin-conjugated Gelatin Hydrogel for Fracture Healing via Angiogenesis and Osteogenesis. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies(CORS)(2010.10.16-20 Kyoto)

Ishida, K., Matsumoto, T., Sasaki, K., Mifune, Y., Tei, K., Kubo, S., Matsushita, T., Takayama, K., Fujita, N., Sasaki, H., Tabata, Y., Kurosaka, M., and Kuroda, R. : Bone regeneration properties of granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) via neovascularization and osteogenesis. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. (2010.10.16-20 Kyoto)

斎藤能彦, 川田啓之, 田畑泰彦: 組織プラスミノゲンアクティベーターを内包化したインテリジェントナノ DDS を利用した新しい血栓溶解療法. 第 26 回日本 DDS 学会ワークショップ(2010.6.17-18 大阪)

Kawata H, Soeda T, Takemoto Y, Sung JH, Uesugi Y, Jo J, Tabata Y, Umaki K, Kato K, Somekawa S, Ishigami K, Horii M, Uemura S, Saito Y.: Development of the new drug delivery system with ultrasound for coronary thrombolysis. American Heart Association, Scientific Sessions 2010(2010.11.13-17 Chicago)

本城邦晃, 高橋謙治, 新井祐志, 井上敦夫, 中川周士, 平岡延之, 田畑泰彦, 久保俊一: BMP-7 徐放化を用いた家兎変形性関節症モデルに対する治療効果の検討. 第 23 回日本軟骨代謝学会(2010.4.2-3 鹿児島)

本城邦晃, 高橋謙治, 新井祐志, 井上敦夫, 寺内 竜, 中川周士, 平岡延之, 井上裕章, 土田真嗣, 田畑泰彦, 久保俊一: BMP-7 含浸ゼラチンハイドロゲル粒子による家兎変形性関節症モデルの治療効果の検討. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会(2010.10.14-15 京都)

Fukata, n., Uchida, K., Kusuda, T., Koyabu, M., Fukui, T., Matsushita, M., Nishio, A., Nakase, H., Chiba, T., Tabata, Y., Okazaki, K.: Development of oral drug delivery system with cyclosporine in experimental colitis. Digestive disease week 2010(2010.5.3 New Orleans)

成田 淳, 高原政利, 佐藤大祐, 荻野利彦, 福島重宣, 木村 祐, 田畑泰彦: 線維芽細胞増殖因子とゼラチンハイドロゲルを用いた家兎半月板修復. 第 2 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学術集会(2010.7.2-4 沖縄)

成田 淳, 高原政利, 佐藤大祐, 荻野利彦, 福島重宣, 木村 祐, 田畑泰彦: 線維芽細胞増殖因子とゼラチンハイドロゲルを用いた家兎半月板修復. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, (2010.10.14-15 京都)

鷺尾絢子, 寺下正道, 西原達次, 田畑泰彦, 北村知昭: 各種培養細胞株へ及ぼすゼラチンスポンジの影響. 第 8 回日本再生歯科医学会学術大会・総会(2010.10.30 名古屋)

## 2) 講演・シンポジウム

田畑泰彦: バイオマテリアル技術からみた再生誘導治療. 岩手医科大学オープンリサーチプロジェクト講演会(2010.1.15 盛岡)

田畑泰彦: 生体機能性高分子ーからだを治すポリマー. KIPS 高分子講座(2010.1.20 京都)

- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生医療と生物医学研究のニューフロンティア．東京大学大学院医学系研究科分子病理学講座セミナー(2010.2.4 東京)
- Tabata, Y.: Biomaterials for regenerative therapy and stem cell biology . Conference of Peach through Mind Brain Science(2010.2.23-25 Hamamatsu)
- 田畑泰彦：再生誘導治療(再生医療)のためのバイオマテリアル細胞足場の設計．医工学フォーラム－2009 年度特別学術講演会－(2010.2.24 京都)
- Tabata, Y.: Frontier of regenerative medicine with biodegradable biomaterials. DSM Biomedical(2010.3.2 Geleen)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生医療と幹細胞生物研究．神戸大学大学院「先端医学トピックス」講義(2010.3.4 神戸)
- 田畑泰彦：医工学技術を利用した再生医療の実現．東北大学未来医工学治療開発センターシンポジウム(2010.3.24 仙台)
- 田畑泰彦：再生医療の最前線と商品化．株式会社モリタ製作所(2010.3.26 京都)
- 田畑泰彦：モノ作り技術から見た再生医療．H22 年度再生医療サポートビジネス懇話会(2010.4.13 京都)
- Tabata, Y.: Tissue engineering for angiogenic therapy of regenerative medicine. The 3<sup>rd</sup> Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research(2010.4.17 Taichung)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルと再生医療．第 21 期第 4 回臨床医学委員会身体機能回復分科会(2010.4.26 東京)
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術からみた先端医療と生物学研究．山形大学特別講演会(2010.5.10 山形)
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術からみた再生医療ビジネス．株式会社日立製作所講演会(2010.5.11 埼玉)
- 田畑泰彦：先端医療を支えるバイオマテリアル(生体材料)と DDS の最前線．東京大学グローバル COE プログラムナノバイオ工学講義(2010.5.20 東京)
- Tabata, Y.: Nanoparticles technology to genetically manipulate the biological functions of stem cells. Particles 2010(2010.5.23 Florida)
- 田畑泰彦：生体シグナル因子とドラッグデリバリーシステム．日本歯科大学講義(2010.6.9 東京)
- 田畑泰彦：生体材料とドラッグデリバリーシステムからみた再生医療．第 3 回同志社大学炎症・再生医療研究センター講演会(2010.6.11 京都)
- 田畑泰彦：生物医学・医療のための高分子材料．第 45 回高分子の基礎と応用講座(2010.6.18 大阪)
- 田畑泰彦：自然治癒力を高めて病気を治す－再生医療の実際－．芦屋市立公民館講座「芦屋川カレッジ」(2010.6.23 芦屋)
- 田畑泰彦：ナノバイオマテリアル技術が切り拓く再生医療のニューフロンティア．第 9 回国際バイオ EXPO&国際バイオフォーラム(2010.7.1 東京)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた患者のための再生医療．千駄木外科セミナー(2010.7.1 東京)
- 田畑泰彦：DDS からみた再生誘導治療．第 30 回日本歯科薬物療法学会(2010.7.3 東京)
- 田畑泰彦：患者まで届いている再生医療の現状と展望．第 3 回あやめ池眼科懇話会(2010.7.8 奈良)
- Tabata, Y.: Tissue regeneration through cell recruitment enhanced by controlled release of biosignaling molecules. 37<sup>th</sup> Annual Meeting and Exposition of CRS(2010.7.10-14 Portland)
- Tabata, Y.: Promoted adipogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells by transfection of small interfering RNA complexed with a cationized dextran. 37<sup>th</sup> Annual Meeting and Exposition of CRS(2010.7.10-14 Portland)

land)

田畑泰彦：バイオマテリアルを用いた自然治癒力 UP と再生医療。第 22 回福島移植フォーラム(2010.7.24 福島)

Tabata, Y.: Clinical experiences with Drug Delivery Systems for regenerative medicine applications. Advances in Tissue Engineering 2010(2010.8.11-14 Houston)

田畑泰彦：細胞周辺環境を与えるバイオマテリアル－再生治療，創薬研究，生物医学研究－。（ヒューマンサイエンス財団勉強会）(2010.8.20 京都)

田畑泰彦：再生医療産業に必要な材料技術－細胞研究，創薬研究，再生治療のために－。和光純薬工業販売代理店中堅社員研修会(2010.8.24 大阪)

田畑泰彦：再生医療の基本概念と再生医療分野の研究開発とモノづくり技術との関係。再生医療を支えるモノづくりシンポジウム(2010.8.31 京都)

田畑泰彦：最先端医療と生物医学研究を支えるバイオマテリアル。神戸大学整形外科講義(2010.9.2 神戸)

田畑泰彦：バイオマテリアルからみた先端医療と生物学研究。平成 22 年度大学院教育コース「医工学連携コース」講義(2010.9.10 滋賀)

Tabata, Y.: Multi-functional biomaterials indispensable for regenerative medicine and stem cell biology. BIN Fusion Symposium on MFMS 2010(2010.9.14 Korea)

Tabata, Y.: Biomaterial technology to manipulate stem cells for regenerative medicine and therapy. TERMIS-AP 2010(2010.9.15-17 Sydney)

田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生医療の今と将来。第 29 回日本運動器移植・再生医学研究会(2010.9.25 京都)

Tabata, Y.: Biomaterial design for DDS and regenerative medicine. 11<sup>th</sup> IUMRS International Conference in Asia (2010.9.27-28 Qingdao)

Tabata, Y.: Tissue engineering necessary for regenerative therapy and cell research. 16<sup>th</sup> International Symposium on Biomedical Science and Technology(2010.9.29-10.2 Istanbul)

Tabata, Y.: Tissue engineering technology for biosignaling molecules in bone regeneration(2010.10.7-10 Hanover)

田畑泰彦：バイオマテリアル技術からみた再生医療。第 9 回北陸ポストゲノム研究フォーラム(2010.10.14 金沢)

田畑泰彦：再生医療(細胞研究，創薬，再生治療)を支えるモノづくり。専門家との直接意見交換シンポジウム～再生医療を支える「モノづくり」の力～(2010.10.19 京都)

Tabata, Y.: Indispensable utilization of biomaterial technology for regeneration therapy and stem cell biology. World Stem Cells and Regenerative Medicine Congress Asia 2010(2010.10.26-28 Seoul)

Tabata, Y.: Biomaterials Technology Indispensable for Tissue Regeneration Therapy. 2<sup>nd</sup> International Conference on Regenerative Surgery(2010.10.27-30 Rome)

Tabata, Y.: Biomaterials Technology for Regenerative Medical Therapy of Next Generation. The Tenth Asian Bio-Ceramics Symposium 2010(2010.11.3 Yogyakarta)

田畑泰彦：モノ作りからみた再生医療－再生治療，創薬研究，細胞研究－。第 4 回日本再生医療学会エデュケーショナルセミナー(2010.11.9 東京)

田畑泰彦：生体組織工学をベースとした再生医療。京都府立医科大学眼科講義(2010.11.10 京都)

田畑泰彦：軟らかさの異なるハイドロゲル細胞培養基材の作製。第 68 回日本化学繊維研究所講演会(2010.11.10 京都)



- 田畑泰彦：よくわかる再生医療と必要なものづくり．京都府ウェルネス産業人材育成セミナー(2010.11.12 京都)
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術を用いた再生医療の最前線．第21回日本レチノイド研究会(2010.11.13 高槻)
- Tabata, Y.: Hydrogel Technology of Drug Delivery System for Pharmacological Therapeutics. 6<sup>th</sup> International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders(2010.11.14 Kyoto)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた組織工学と再生医療．第48回日本人工臓器学会大会(2010.11.19 仙台)
- Tabata, Y.: Regenerative medical therapy based on Drug Delivery Technology of tissue engineering. BIT's 3rd Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells(2010.12.7 Shanghai)
- 田畑泰彦：モノづくり技術からみた再生医療．バイオの都・関西セミナー～再生医療の未来を拓く関西～(2010.12.9 大阪)
- 田畑泰彦：モノづくり技術からみた再生医療(再生治療，生物医学研究，創薬)．KRP 再生医療の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座(2010.12.13 京都)
- Tabata, Y.: Tissue engineering for regenerative medicine and stem cell biology. Mahidol-Kyoto Universities International Symposium 2010(2010.12.16-17 Thailand)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた細胞力アップ治療．第6回日本インターベンショナルラジオロジー(IVR)学会九州地方会(2010.12.18 福岡)
- 山本雅哉：多孔質バイオマテリアルを利用した3次元脈管組織モデルの構築．「第1回 Bio-creation 研究会」(2010.1.25 松山)
- 山本雅哉：機能性足場材料の作製に利用可能な表面ならびに三次元加工技術．「京都リサーチパーク第6回再生医療サポートビジネス懇話会」(2010.2.19 京都)
- 山本雅哉：徐放化骨形成因子を組み込んだ機能性バイオマテリアルを用いた放射線照射骨欠損の再生誘導．「第2回日本再生医療学会 YIA 受賞者講演」(2010.3.18 広島)
- Yamamoto, M.: Development of functional biomaterials to modulate cell behaviors. The Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden seminar(2010.8.30 Dresden)
- Yamamoto, M. and Tabata, Y.: Biomaterial Technology to Manipulate Stem Cells for Regenerative Medicine and Therapy. TERMIS-AP(2010.9.15 Sydney)
- 山本雅哉, 田畑泰彦：再生医療・細胞研究・創薬のためのバイオマテリアル技術．「BioJapan 2010」(2010.9.29 横浜)
- Yamamoto, M.: Development of functional biomaterials to modulate cell behaviors. The Professor Mikos Laboratory Seminar at Department of Bioengineering, Rice University(2010.10.5 Houston)
- Yamamoto, M.: Biomolecules-functionalized scaffolds for stem cell growth and differentiation. ISOMRM 2010(2010.11.5 Zhunan)
- 山本雅哉：再生医療におけるバイオマテリアルの重要性．「福井大学 ものづくり講演会」(2010.11.26 福井)
- 山本雅哉：細胞周辺環境としての機能性バイオマテリアル足場の開発．「第32回日本バイオマテリアル学会大会 平成22年度日本バイオマテリアル学会科学奨励賞 受賞者講演」(2010.11.29 広島)
- 黒田良祐, 久保晴司, 石田一成, 佐々木謙, 藤田周史, 松下雄彦, 松本知之, 田畑泰彦, 黒坂昌弘：高分子ハイドロゲルを用いた整形外科領域の再生医療研究．第32回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)
- Kuroda R, Matsumoto T, Ishida K, Kubo S, Fujita N, Kurosaka M, Tabata Y.: Application for biomaterials-based regenerative medicine for orthopaedic surgery. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific meeting (TERMIS-AP) (2010. 9.14-17 Sydney, Australia)

## 組織修復材料学分野 Department of Reporative Materials

分野主任 教授 岩田 博夫

Prof. Hiroo Iwata

### 【研究概要】

当研究分野では、病気や怪我の治療に役立つ人工材料を創り出すための研究を行っています。それらの材料は人体の中で機能したり、体外での細胞操作・分析に効力を発揮するなど、その目的と機能は様々です。当研究分野ではおもに、高分子を中心とする有機材料や、細胞や生体分子を制御・分析するための様々な技術を駆使することによって、それらの研究を進めています。このような研究を通じて、再生医療や低侵襲手術のような高度先進医療に貢献したいと考えています。

#### 材料-生体システム間相互作用の解析

体内に人工材料を埋込むと異物を排除しようと様々な生体反応が起こります。人工血管や人工心臓などを体内で長期間機能させるには、これらの生体反応を深く理解しコントロールする必要があります。当研究室では、様々な分析手法を用いて人工材料表面で生体反応が起こる仕組みを調べています。また、病気の判定基準となる血液中のバイオマーカーを高感度で検出できる装置を開発し、患者のそばですぐに結果を出せる検査システムの確立を目指しています(図1)。

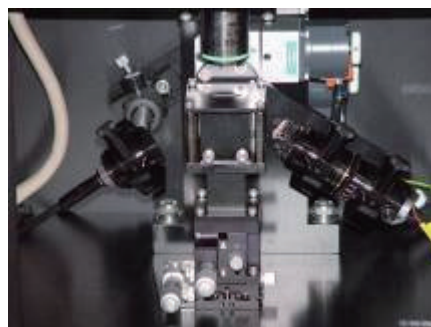


図1. 血液中のバイオマーカーを迅速・高感度計測するための装置。

#### 細胞表面修飾とその応用

細胞移植による臓臓や中枢神経の再生医療に大きな期待が寄せられています。しかし、移植された細胞の機能を高く維持するには、細胞がレシピエントの生体防御機構からの攻撃に打ち勝たなければなりません。これには両親媒性高分子からなる薄膜によって細胞を被覆する方法が有効であることを示してきました(図2)。また、細胞の表面修飾技術を応用すれば、細胞間の接着を引き起こすことが可能です。この技術を利用することで、ES細胞やiPS細胞の分化誘導について調べることができ、再生医療への新しい知見を得ることが期待できます。

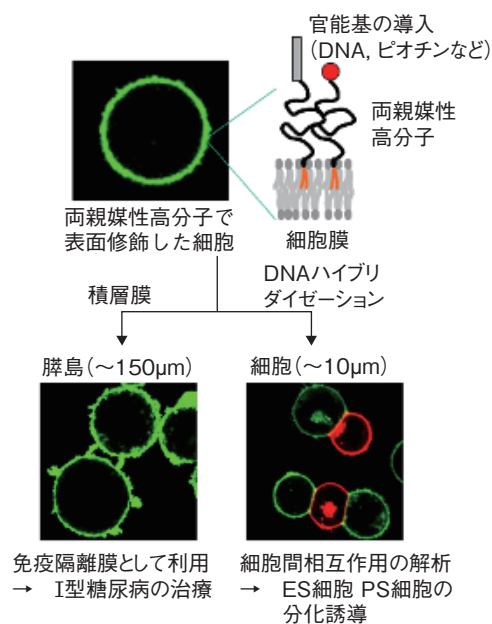


図2. 両親媒性高分子薄膜による細胞の被覆。

#### ES細胞/iPS細胞の凍結保存技術の確立

ES細胞やiPS細胞を利用した再生医療を確立するには、安定した細胞供給が必要になります。当研究分野では、細胞の生存率

を高く維持しながら凍結保存することに成功し、その技術の実用化に向けて研究を進めています。

### 血管内手術用具の開発

患者への負担の大きい外科的治療に対して、カテーテルを血管内に挿入して動脈瘤などを治療する方法(血管内治療)が注目されています。動脈瘤に詰め物をしてしまうコイル塞栓術と血管の正しい流れを確保するカバードステント留置術の二つの方法で(図3)、多様な形状をもつ動脈瘤の破裂を未然に防ぐデバイスを開発しています。これには、血液や血管表面と材料との相互作用や、材料の力学的・化学的性質を考慮したデバイス設計が求められます。

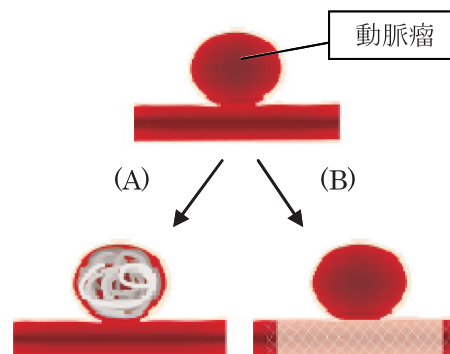
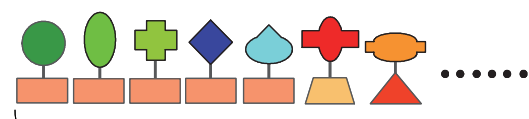


図3. (A)コイル塞栓術および(B)カバードステント留置術の模式図。

### 中枢神経の再生医療に向けた機能材料の設計

中枢神経疾患の一つであるパーキンソン病を、細胞移植によって治療する試みがなされています。しかし、そのような治療法を普及させるには、移植細胞源となる神経幹細胞の大量確保や、移植細胞の生着率向上を可能にする技術が確立されなくてはなりません。当研究分野では、大量の移植細胞を効率よく調製するための細胞培養デバイスの設計を行うとともに、移植細胞を保護するための蛋白質性材料の開発に取り組んでいます。これらの機能材料の構成要素には、合理的にデザインされた人工蛋白質が有用です(図4)。

細胞制御能と基材結合能をもつ種々のキメラ蛋白質を設計



目的とする機能に応じて適切なキメラ蛋白質を基材と複合化

細胞培養用デバイス  
(ガラス・合成高分子ベース)

移植細胞保護材料  
(生体高分子ベース)



図4. キメラ蛋白質を構成要素とするデバイスおよび機能材料の設計。

### 細胞チップ分析技術の確立

多種類の生体分子の機能を迅速に分析するための細胞チップの開発を行っています。アルカンチオール自己組織化単分子膜のマイクロパターンをもつ基板材料を利用して多種類のDNA、RNA、蛋白質など配列固定し、それらを同時に細胞に作用させることで、固定された分子の生物学的機能を並列分析することが可能です(図5)。細胞チップ分析法は、生物学研究のみならず、再生医療、医薬品開発、臨床検査などの様々な分野に大きなインパクトを与えるものと期待しています。

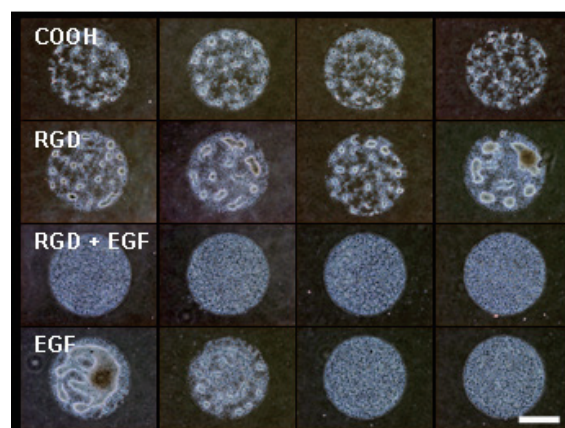


図5. 細胞チップによる蛋白質性材料のハイスループット機能アッセイの一例。

Our research group intends to develop engineered materials that contribute practically and efficiently to the advanced therapeutic interventions for the treatment of diseases and traumatic injuries. These materials are ex-

pected to exhibit diverse functions in vitro or in vivo. Fundamental and applied studies are undertaken to realize such biomaterials, taking advantage of organic materials, namely polymeric materials and state-of-the-art techniques for analyzing and handling biomolecules and cells.

Research subjects currently undertaken in our department are listed below.

#### **Surface chemistry of biomedical materials**

Protein adsorption and complement activation are involved in the initial reactions against man-made materials with living bodies. It is necessary to elucidate these mechanisms in relation to the surface properties so as to rationally design biocompatible surfaces of synthetic implants. Most of information on protein adsorption and complement activation by artificial polymeric materials has been accumulated from studies with polymeric materials. However, polymer surfaces could not be assumed rigid and immobile at equilibrium. The polymer molecules in the vicinity of the surface or interface would exhibit motion and relaxation in response to the different interfacial environments. Thus, it is difficult to prepare model surfaces using polymeric materials for studies of the complement activation. Self-assembled monolayers of alkanethiols formed on a gold thin film provide well-defined model surfaces suitable for studies on interfacial phenomena and intermolecular interactions. The surface plasmon resonance technique can be applied to analyze the interfacial phenomena under water. We have been studying protein adsorption, complement activation, and cell adhesion on well-defined surfaces made of self-assembled monolayers using the surface plasmon resonance technique as well other analysis techniques highly sensitive for interfacial molecular events.

#### **Polymeric materials for cell transplantation therapy**

Islets of Langerhans have been transplanted to treat insulin-dependent diabetes patients. Adult pancreatic  $\beta$  cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing  $\beta$  cells from cadaver donors or animals should be employed. In bioartificial pancreas, islets are encapsulated into a semi-permeable membrane and then implanted into the diabetic patients to protect them from immune rejection. The semi-permeable membrane permits permeation of oxygen and nutrient which are necessary for islet survival, but prohibits contact of islet cells with components of the host immune system. We encapsulated islets into agarose-based microbeads and induced normalization of blood glucose levels of diabetic recipient mice by implanting 1000 microencapsulated hamster islets into the peritoneal cavity.

Several research groups showed that transplantation of neural stem cells (NSCs) or NSC-derived progenitors to the site of lesions was effective for structural and functional restoration of the central nervous system. However, clinical applications of NSC further require methodological advances especially for controlling the engraftment, proliferation, migration, and differentiation of NSCs. Our approach is to construct composite biomaterials that consist of extracellular matrix(ECM)components and signaling molecules such as growth factors and cell adhesion molecules. We are employing genetic engineering to design rationally such composite biomaterials.

#### **Cell processing technology for regenerative medicine**

Cells and ECMs are important components for regenerative medicine. In recent years, many research groups

have devoted enormous efforts to establish *in vitro* culture conditions in which stem cells, such as ES cells and tissue-derived stem cells, differentiate into various functional cells. Those cells are expected to be very useful for treatment of various diseases. Many kinds of stromal cells have been used to differentiate stem cells to functional cells. However, most of stromal cells preferentially used are derived from mice. Some authorities who are in charge of regulatory issue have pointed out the difficulty to rule out the possibility that retrovirus incorporated in mouse gene will be activated and transferred to stem cells and functional cells derived from stem cells. One of our research activities is focused on the development of stromal cell free culture systems used for the induction of ES cells to various functional cells. ES cells cultured on the substrate, onto which bioactive molecules isolated from stromal cells, are immobilized effectively differentiated to dopaminergic neurons.

Conventional cell culture substrates are not always suitable for cells used for regenerative medicine. Neurons differentiated from ES cells *in vitro* are very difficult to be collected from a cell culture flask without deterioration of cell functions, because long axons from neurons are easily damaged during detachment of neural cells from the cell culture substrate. Cell sheets but not single cells are needed in some instance, such as regeneration of a skin and a mucous membrane. We have been examining a film of cellulose derivatives for a cell culture substrate. Cells cultured on it are removed by cellulose-degrading enzyme, cellulase, without damaging cells on the substrate.

#### Cell chips for high-throughput functional screening

Transfectional array : Functional characterization of human genes may be one of the most challengeable tasks in the post-genome era. Due to a huge number of novel genes discovered in genomics, high-throughput methods are required to express or silence in parallel thousands of genes in living cells. The objective of our study is to fabricate transfectional arrays through patterning of self-assembled monolayers on a gold substrate and the subsequent site-specific spotting of different expression vectors or short interfering RNAs.

Antibody array : Recent progress in stem cell research provides us with promising options of cell sources for use in tissue engineering. However, insufficient knowledge about specific surface antigens expressed on most of stem cells limits their application in regenerative medicine. To solve this problem, we developed a high-throughput analytical method for typing multiple membrane proteins. Our method is based on solid-phase cytometry using an antibody array prepared on a patterned alkanethiol monolayer.

ECM array : Arrays that display a panel of biologically-active substances on a flat plate are promising due to their potential use in functional screening over multiple samples in a parallel fashion. We developed cell-based arrays that displayed combinatorially various ECM-growth factor composites and used them for parallel and rapid screening biomaterials that serve to maintain NSCs and direct the differentiation of NSCs.

### 【業績目録】

#### ◆ 誌上発表 ◆

##### 1) 原著論文

Teramura Y., Chen H., Kawamoto T., Iwata H. : Control of cell attachment through polyDNA hybridization. *Biomaterials*, **31**, 2229-2235 (2010).

- Teramura Y., Nguyen M. L., Kawamoto T., Iwata H. : Microencapsulation of islets with living cells using polyDNA-PEG-lipid conjugate. *Bioconjug. Chem.*, **21**, 792-796 (2010)
- Hisano N., Iwata H., Teramura Y., Hao C., Ikada Y. : Kinetic analysis of thiol-disulfide exchange reactions in the formation of disulfide hydrogel, *J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem.*, in press
- Nishigaki T., Teramura Y., Nasu A., Takada K., Toguchida J., Iwata H. : Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution. *Int. J. Dev. Biol.*, in press
- Nishigaki T., Teramura Y., Suemori H., Iwata H. : Cryopreservation of primate embryonic stem cells with chemically-defined solution without Me<sub>2</sub>SO. *Cryobiology*, **60**, 159-164 (2010).
- Inui O., Teramura T., Iwata H. : Retention dynamics of amphiphilic polymers, PEG-lipids and PVA-alkyl, on the cell surface, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2**, 1514-1520 (2010)
- Zhao T., Harada H., Teramura Y., Tanaka S., Itasaka S., Morinibu A., Shinomiya K., Zhu Y., Hanaoka H., Iwata H., Saji H., Hiraoka M. : A novel strategy to tag matrix metalloproteinases-positive cells for *in vivo* imaging of invasive and metastatic activity of tumor cells. *J. Controlled Release*, **144**, 109-114 (2010)
- Arima Y., Kawagoe M., Furuta M., Toda M., Iwata H. : Effect of swelling of poly(vinyl alcohol) layers on complement activation, *Biomaterials*, **31**, 6926-6933 (2010)
- Fujimoto H., Kato K., Iwata H. : Layer-by-layer assembly of small interfering RNA and poly(ethyleneimine) for substrate-mediated electroporation with high efficiency. *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 571-578 (2010)
- Toda M., Arima Y., Iwata H. : Complement activation on degraded polyethylene glycol-covered surface. *Acta Biomater.*, **6**(7), 2642-2649 (2010).
- Toda M., Iwata H. : Effects of Hydrophobicity and Electrostatic Charge on Complement Activation by Amino Groups. *ACS. Appl. Mater. Interfaces*, **2**(4), 1107-13 (2010).
- Sano H., Toda M., Sugihara T., Uchiyama N., Hamada J., Iwata H. : Coils coated with the cyclic peptide SEK-1005 accelerate intra-aneurysmal organization. *Neurosurgery*, **67**(4), 984-992 (2010).
- Hamada K., Matsushima S., Toma N., Totani T., Toda M., Ogawa S., Asakura F., Sakaida H., Iwata H., Taki W. : Simple immersion of filter devices into an urokinase solution prevents fibrin net formation during carotid artery stenting. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **95**(1), 171-176 (2010)
- Chen H., Teramura Y., Iwata H. : Co-immobilization of urokinase and thrombomodulin on islet surfaces by 6 poly(ethylene glycol)-conjugated phospholipid. *J. Controlled Release*, in press.
- Nguyen M. L., Teramura Y., Iwata H. : Immobilization of sCR1 to agarose-encapsulated islets for the prevention of complement activation. *Biomaterials*, **31**, 8847-8853 (2010)
- Konagaya S., Kato K., Nakaji-Hirabayashi T., Iwata H. : Design of culture substrates for large-scale expansion of neural stem cells. *Biomaterials*, **32**, 992-1001 (2011)

## 2) 著 書

- Teramura Y., Chen H., Takemoto N., Sakurai K., Iwata H. : Polymeric materials for surface modification of living cells, *Polymeric Biomaterials, Volume II, Medicinal and Pharmaceutical Applications of Polymers : Third Edition*, S Dumitriu ed. CRC Press/Taylor and Francis Group, in press
- 寺村裕治：幹細胞－糖尿病の治療を目指して－，バイオマテリアルの基礎 印刷中 (2010) 日本医学館

### 3) 総 説

Kato K, Iwata H.: High-throughput analyses of gene functions on a cell chip by electroporation. *Methods in Molecular Biology ; Cell-Based Microarrays: Methods and Protocols* (Ella Palmer, ed., Springer Heidelberg), in press

竹本直紘, 寺村裕治, 岩田博夫: 細胞移植の成績向上を目指した細胞膜の修飾, 膜(MEMBRANE), **35**, 210-216(2010)

Teramura Y., Iwata H.: Cell surface modification with polymers for biomedical studies, *Soft Matter*, **6**, 1081-1091 (2010)

Teramura Y., Iwata, H.: Bioartificial pancreas - Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans -. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 827-840(2010)

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

岩田博夫, 寺村裕治: ポリエチレングリコール結合脂質を用いた膵島の表面修飾と生着率の向上. 第13回日本異種移植研究会(2010.3.14 東京)

Kato K, Konagaya S, Nakaji-Hirabayashi T, Iwata H.: Culture substrates with immobilized growth factors for use in in vitro expansion of human neural progenitor cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, 2010 Asia Pacific Meeting*(2010.9.15-17 Sydney).

加藤功一, 梶谷和弘, 中路 正, 岩田博夫: 神経幹細胞に発現する機能的ケモカイン受容体のパラレル分析. 第32回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

寺村裕治, 岩田博夫: 細胞表面修飾における膵島の生着率の向上. 第37回日本膵・膵島移植研究会(2010.3.13 宇都宮)

寺村裕治, 岩田博夫: ポリエチレングリコール結合脂質を用いた膵島の表面修飾と生着率の向上, 第13回日本異種移植研究会(2010.3.14 東京)

Arima, Y., Kawagoe, M., Furuta, M., Toda, M., Iwata, H.: Complement activation by polymers carrying hydroxyl groups. *Gordon Research Conferences –Biointerface Science-*(2010.9.5-10, Switzerland)

Arima, Y., Iwata, H.: Cell adhesion to well-defined surfaces competitively adsorbed with fibronectin and albumin. *Core-to-Core 2010 World Network Seminar on Advanced Particle Science and Technology*(2010.11.23-26, Kyoto)

有馬祐介, 岩田博夫: 表面官能基の異なる自己組織化単分子膜におけるフィブロネクチン／アルブミン競争吸着と細胞接着の関係, 第32回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

戸田満秋, 有馬祐介, 岩田博夫: 表面プラズモン励起蛍光をもちいたバイオマーカーの高感度計測, 第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会(2010.11.17-18 名古屋)

中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 細胞接着性キメラ蛋白質担持コラーゲンゲルによる移植神経幹細胞の生存率向上: 第39回医用高分子研究会シンポジウム(2010.7.26-27 東京)

中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 神経栄養因子固定培養基材を用いたドーパミン産生細胞への分化誘導: 第32回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

藤田 聡, 岩田博夫: シングルナノファイバーを利用した1次元方向の細胞移動解析, 第32回日本バイオマテリ



アル学会大会(2010.11.29-30 広島)

陳 顯, 寺村裕治, 岩田博夫: PEG 脂質を用いた生理活性物質の臍島表面への固定, 第 59 回高分子学会年次大会(2010.5.26-28 横浜)

小長谷周平, 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 細胞増殖因子を固定した基材上でのヒト神経前駆細胞の選択的増殖, 第 59 回高分子学会年次大会(2010.5.26-28 横浜)

小長谷周平, 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 上皮増殖因子および塩基性繊維芽細胞増殖因子を固定した培養基材上でのヒト神経前駆細胞の選択的増殖, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会 (2010.11.29-30 広島)

小村 嵩, 加藤功一, 岩田博夫: 細胞外マトリックス上でのマウス人工多能性幹細胞の神経分化, 第 5 回日本バイオマテリアル学会・関西若手研究発表会(2010.8.6 京都)

小村嵩, 加藤功一, 岩田博夫: マウス人工多能性幹細胞から誘導された神経幹細胞の増殖に及ぼす細胞外マトリックスの影響, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

竹本直紘, 寺村裕治, 岩田博夫: オリゴ DNA の相補対形成による臍島表面へのウロキナーゼ固定化, 第 5 回日本バイオマテリアル学会関西若手研究発表会(2010.8.6 京都)

竹本直紘, 寺村裕治, 岩田博夫: 免疫拒絶反応の抑制を目指した臍島表面へのセルトリ細胞固定化, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11.29-30 広島)

村上隆史, 有馬祐介, 戸田満秋, 岩田博夫: 高分子薄膜による表面プラズモン励起蛍光分光法におけるエネルギー移動の抑制, 第 59 回高分子学会年次大会(2010.5.26-28 横浜)

Luan, M. N., Teramura Y., Iwata H.: Islet microencapsulation within sCR1-immobilized agarose gel. 第 59 回高分子学会年次大会(2010.5.26-28 横浜)

櫻井研吾, 寺村裕治, 岩田博夫: ポリエチレングリコール複合脂質を用いた細胞の表面修飾と二次元配列, 第 56 回高分子研究発表会(2010.7.16 神戸)

古田雅典, 有馬祐介, 戸田満秋, 岩田博夫: ポリビニルアルコール固定化表面のがん巣状態と補体活性化, 第 56 回高分子研究発表会(2010.7.16 神戸)

村上順一, 有馬祐介, 戸田満秋, 岩田博夫, 熊田陽一, 岸本通雅: 単鎖抗体の高感度蛍光イムノアッセイへの応用, 第 56 回高分子研究発表会(2010.7.16 神戸)

## 2) 講演・シンポジウム

岩田博夫: 医工学から再生医学へ, 日本化学会第 90 春季年会(2010.3.27 大阪)(招待講演)

岩田博夫, 櫻井研吾, 寺村裕治: 細胞を並べる・細胞が並ぶ, ナノ学会第 8 回大会(2010.5.13 岡崎)(招待講演)

岩田博夫: 細胞表面の修飾による生体適合性の付与, 日本膜学会第 32 年会(2010.5.14 東京)(招待講演)

岩田博夫: 移植成績の向上を目指した細胞表面処理, 第 9 回日本組織移植学会総会・学術集会(2010.8.28 福島)(特別講演)

岩田博夫: 再生医療用材料開発, バイオエンジニアリング研究会講演会(2010.11.16 東京)

岩田博夫, 櫻井研吾, 寺村裕治: オリゴ DNA を用いた細胞の基板上への配置と幹細胞の分化制御, 第 68 回日本化学繊維研究所講演会(2010.11.10 京都)

岩田博夫: 細胞の配置・配列さらに高次組織体の構築, 革新ナノバイオデバイス研究センターセミナー(2010.12.1 名古屋)

Teramura Y., Iwata H.: Cell Surface Modification with Polymers for Biomedical Studies. 4th International Sympos-

sium on Nanomedicine (ISNM 2010), (2010.11.29-12.1 Okazaki)

加藤功一, コラーゲンと再生医療: タンパク質工学によるコラーゲンの高機能化, 繊維学会 先端繊維講演会 (2010.3.5 京都)

Kato K, Nakaji-Hirabayashi T, Iwata H.: Protein Engineering Approaches for Central Nervous Regeneration, 2010 International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (2010.11.3-5 Zhunan)

有馬祐介: 粉体工学会, 性状が明確なモデル表面と細胞との相互作用, 第46回夏期シンポジウム「ナノ粒子・人工材料と相互作用する生物-細胞を中心に生体関連物質から生体まで-」(依頼講演) (2010.8.9-10 京都)

Toda, M.; Arima, Y.; Iwata, H.: Surface Plasmon Field Enhanced Fluorescence Spectroscopy for Quantitative Analysis of Infinitesimal Bio-makers. 4th International Symposium on Nanomedicine (ISNM 2010), (2010.11.29-12.1 Okazaki)

## 生体物性学分野（国内客員） Department of Mechanical Properties

客員教授 鳥光 慶一

Visiting Prof. Keiichi Torimitsu

### 【研究概要】

生体における情報伝達機能の解明とその利用を目標に、P2X<sub>4</sub>、NMDA、AMPA や GABA 等の受容体タンパク質を中心に構造と機能の相関性について解明を進めるとともに、バイオミメティックなデバイスの構築について研究を進めている。

研究は昨年度に引き続き、(1)液中高速 AFM による精製及び再構成した受容体タンパク質の動的構造の観察と機能相関 (2)MEA による神経活動計測、埋込み型の検討(3)ナノキャビティ構造・脂質膜を用いたモデルシナプス構築を中心に進め、本年度新たに岩田博夫教授、加藤功一准教授とともに神経幹細胞の分化と電気計測に取り組んだ。一方、オックスフォード大をはじめとする海外研究機関との共同研究にも努めた。

#### (1) 液中高速 AFM による精製及び再構成した受容体タンパク質の動的構造観察

受容体タンパク質の構造変化と機能との相関性を解析することは、生体における情報伝達の仕組みを理解し、利用する上で極めて重要である。溶液中での高速原子間力顕微鏡(AFM)の利用は、生理条件下における受容体タンパク質のナノスケールでの構造解析をリアルタイムに近い状態で観察できる有効な手段である。

NMDA 受容体に関しては、アゴニストやアンタゴニスト等のリガンドに対する細胞外ドメイン(N 末ドメイン)が活性化/非活性化に伴い、大きな変化を引き起こすなど、結合サイトへのリガンド結合の様子を観察することができた。また、AMPA 受容体(オックスフォード大との共同研究)、GABA 受容体についても細胞外ドメイン構造のリガンド応答を観察することができた。

#### (2) MEA による神経活動計測、埋込み型の検討

現在まで、MEA(多点微小電極アレイ)を介した脳神経系とのコミュニケーション手段の構築に取り組んでおり、生体適合性の高い、導電性高分子ゲルを利用することで長期間(数ヶ月以上)に渡る神経活動計測／刺激を行ってきた。今年度は、脳および脊髄への埋込み可能な電極を作製し、慶応義塾大学と共同で研究しているアンプ系の LSI チップ化との組み込みおよびワイヤレス化の検討を進めた。

一方、Mg についても Mg 動態の解析を進め、その役割解明に努めた。

さらに今期、神経幹細胞の電気計測に取り組み、分化との関連性についても検討を進めた。

#### (3) ナノキャビティ構造・脂質膜を用いたモデルシナプス構築

シリコン基板上に大きさが数百ナノメートルのナノキャビティ構造を作製し、そのキャビティ上にチャンネル型タンパク質を含む脂質膜をかぶせることでモデルシナプスを作製した。キャビティ内に閉じ込めたイオン蛍光プローブの蛍光変化により、刺激に伴うキャビティ内外への分子の移動について検討した。これにより、キャビティ内へのイオンの輸送、評価についての基礎的データをを得ることができた。

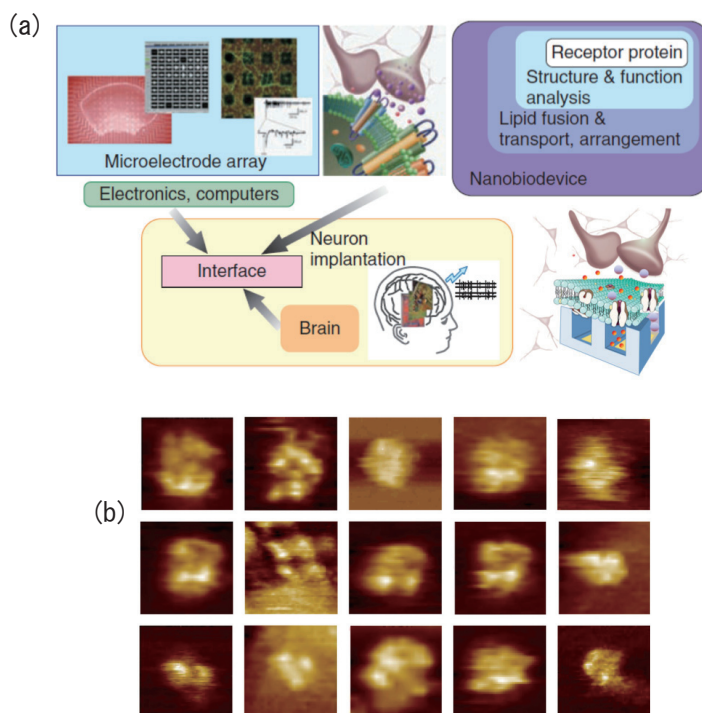


図 受容体タンパク質を使った研究目標(a)と, AMPA 受容体の液中 AFM による観察(b)

今後, キャビティ内に電極を設置し, イオンの動態について電氣的に計測する予定である.

Our interest is to understand the mechanism of information processing in the brain and to develop devices that can communicate with the brain using receptor proteins, such as P2X4, NMDA, AMPA and GABA. The key idea behind this work is based on the relationship between conformational change and function.

Here I describe our study of (1) the conformational analysis of purified/reconstituted receptor protein by high-speed AFM under physiological conditions, (2) neural activity measurement using MEA and implantable MEA and (3) model synapse formation using a nano-cavity with a lipid bilayer. Last year (2010) we studied the electrical analysis of neural stem cells using MEA. Some studies were undertaken collaboratively with foreign universities, including the University of Oxford and the University of Adelaide.

#### (1) Conformational analysis of purified/reconstituted receptor protein by high-speed AFM under physiological conditions

Although we know that receptor protein is very important in information processing, only a few technologies, such as cryogenic transmission electron microscopy and X-ray diffraction, can provide us with images of single receptors. However, most methods require dry conditions or low temperature.

We have succeeded in visualizing P2X4, NMDA, AMPA and GABA receptors under physiological conditions in real time by using high-speed atomic force microscopy. As a receptor normally works with a membrane, we studied them either in purified form or reconstituted with membrane receptors for analysis. We observed changes in the extracellular domain structure. We collaborated with the University of Oxford on the analysis of AMPA receptors.

## (2) Neural activity measurement using MEA and implantable MEA

Constructing an interface between neurons and electrical instruments is one of our goals with regard to developing tools for communicating with the brain. We use conducting polymer hydrogels to achieve better biocompatibility and low impedance. Major challenges are to obtain a stable longer connection and to realize wireless capability with our miniaturized measurement system. We hope this will enable us to achieve an implantable interface.

As little is known about the role of Mg in neural activity, we studied changes in the intracellular Mg concentration. We also began neural stem cell experiments with MEA to understand neural differentiation.

## (3) Model synapse formation using nanocavity with lipid bilayer

We have considered the formation of a model synapse using a nanocavity with a lipid bilayer. Fluorescence changes in the nanocavity indicated the ionic flow dynamics through the membrane. We are preparing to undertake electrical measurements of the ionic dynamics in the cavity.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

- Y. Shinozaki, K. Sumitomo, K. Furukawa, H. Miyashita, Tamba, N. Kasai, H. Nakashima, K. Torimitsu, Visualization of membrane protein suspended over nanoscale well, *Appl. Phys. Express*, **3**, 027002-1-3, 2010
- Y. Kashimura, K. Furukawa, K. Torimitsu, Self-Spreading Supported Lipid Bilayer Passing through Single Nanogap Structure : Effect of Position of Dyes in Lipid Molecules, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **49**, 04DL15-1-5, 2010
- M. Yamaguchi, N. Nakano, A. Shimada and K. Torimitsu, Multi-channel bio sensing and stimulation LSI chip using 0.18  $\mu\text{m}$  CMOS process, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **49**, 04DL14-18, 2010
- N. Kasai, C. S. Ramanujan, I. Fujimoto, A. Shimada, J. F. Ryan, K. Torimitsu, AFM observation of single, functioning ionotropic glutamate receptors reconstituted in lipid bilayers, *BBA Gen. Sub.*, **1800**, 655-661, 2010
- H. Nakashima, K. Furukawa, Y. Kashimura, K. Sumitomo, Y. Shinozaki and K. Torimitsu, Pattern formation and molecular transport of histidine-tagged GFPs using supported lipid bilayers, *Langmuir*, **26**, 12716-12721, 2010
- 

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

- K. Torimitsu, Y. Shinozaki, N. Kasai, A. Shimada, K. Sumitomo and Y. Furukawa, Analysis of receptor conformation and its functional relations for biomimetic device, *9<sup>th</sup> International Conference Medical Applications of Novel Biomaterials and Nano-biotechnology, CIMTEC2010*, Montecatini Terme, Italy, 2010.6.13-18
- S. Tsukada, A. Shimada, K. Torimitsu, Flexible multielectrode array using Conductive polymer and collagen multi channels ; Designed for less invasive neural recording from Spinal Cord and Brain Cortex, *40th annual meeting of the Society for Neuroscience, Neuroscience 2010*, San Diego, USA, 2010
- K. Torimitsu, Conformational nanostructure analysis of receptor protein and its application for biomimetic device

formation, *Gordon Research Conferences, Nanostructure Fabrication*, Tilton, USA, 2010.7.18-22(invite)

K. Torimitsu and Y. Furukawa,  $Mg^{2+}$  effect on rat neural activity in vitro, *40th annual meeting of the Society for Neuroscience, Neuroscience 2010*, San Diego, USA, 2010

A. Tanaka, Y. Shinozaki, K. Sumitomo, M. Tsuda, S. Koizumi, K. Inoue and K. Torimitsu, AFM observation of membrane proteins suspended over nanoscale well, *The 18<sup>th</sup> International Colloquium on Scanning Probe Microscope*, Atagawa, Japan, 2010.12.

K. Sumitomo, Y. Tamba, Y. Shinozaki and K. Torimitsu, Formation of liquid ordered domain on Si substrate using giant unilamellar vesicles, *The 18<sup>th</sup> International Colloquium on Scanning Probe Microscope*, Atagawa, Japan, 2010.12.

T. Goto, H. Inokawa, Y. Ono, A. Fujiwara and K. Torimitsu, Effect of Device Structure on Electrical Conduction of Terphenyl-based Molecule, *SSDM2010*, 2010

篠崎陽一, 住友弘二, 鳥光慶一, 原子間力顕微鏡を用いた NMDA 受容体の一分子観察, 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16-3.18

後藤東一郎, 猪川 洋, 小野行徳, 藤原 聡, 鳥光慶一, フェニル系共役分子を用いた単一分子素子の伝導特性, 19p-ZF-3, 第 57 回応用物理学関係連合講演会, 東海大学, 2010.3.17-3.20

檜村吉晃, 古川一暁, 鳥光慶一, 単一ナノギャップ中を自発展開する脂質二分子膜の運動性: 脂質分子中の色素結合位置依存性, 18a-ZF-2, 第 57 回応用物理学関係連合講演会, 東海大学, 2010.3.17-3.20

住友弘二, 丹波之宏, 篠崎陽一, 鳥光慶一, Si 基板上の井戸への脂質二分子膜シールと蛍光分子の閉じ込め, 第 57 回応用物理学関係連合講演会, 東海大学, 2010.3.17-3.20

篠崎陽一, 住友弘二, 河西奈保子, 津田 誠, 小泉修一, 井上和秀, 鳥光慶一, 原子間力顕微鏡を用いた P2 受容体の一分子薬理学研究, 九州大学研究会, 九州大学, 福岡, 2010.5.7

篠崎陽一, 住友弘二, 古川一暁, 河西奈保子, 中島 寛, 鳥光慶一, 生体膜及び生体膜貫通タンパク質の AFM を用いた直接観察, 有機・バイオ SPM 研究会, 東京, 2010.9.3

井上鈴代, 瀬山倫子, 河西奈保子, 岩崎 弦, 堀内 勉, 高橋淳一, 鳥光慶一, 為近恵美, 抗体アレイを用いた表面プラズモン共鳴センサの開発, 第 33 回分子生物学会年会・第 83 回生化学大会合同大会, 神戸, 3P-1244, 2010.12.09

## 2) 講演・シンポジウム

K. Torimitsu, Nanobiodevice architecture using receptor protein, *International Conference on Nanoscience and Nanotechnology (ICONN 2010)*, Sydney, Australia, 2010.2.22-26 (招待講演, Plenary talk)

K. Torimitsu, Receptor Protein Based Nanobio-interface, *Asia-Pacific Symposium on Nanobionics*, Wollongong, Australia, 2010.6.9-11 (招待講演)

K. Torimitsu, Functional analysis of receptor protein for biomimetic device formation - structure and function -, *4th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2010)*, Okazaki, Japan, 2010.11.28-12.1 (招待講演, Special lecture)

K. Torimitsu, Functional analysis of receptor protein for biomimetic device formation - structure and function -, *The 4th Mt. Lofty workshop on frontier technologies for nervous system function and repair*, Adelaide, Australia, 2010.12.17-12.19 (招待講演)

# 再生統御学研究部門

## 発生分化研究分野 Department of Development and Differentiation

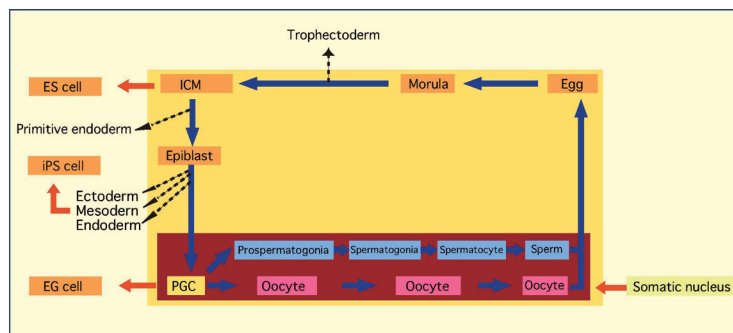
分野主任 教授 中辻 憲夫

Prof. Norio Nakatsuji

### 【研究概要】

個体を構成する細胞系譜は全て一つの受精卵から多能性幹細胞、組織幹細胞等を経て成熟分化を行う。各種の体細胞はそれぞれ特異的な機能発現を行い生体の恒常性を維持する一方、生殖細胞は発生初期に多能性幹細胞から体細胞とは系譜が分かれ、配偶子形成プロセスを通じてゲノム情報の維持と再編、エピゲノム修飾の再構成等を行い、次の個体発生の為の遺伝プログラムを継承する。これら幹細胞－生殖細胞サイクルにおけるゲノム、エピゲノムプログラムは個体及び種が成立する根幹として厳密に制御される一方、その破綻は広範な疾患、例えば発生異常、遺伝病、癌、不妊等の病態の起因となる。当研究グループは幹細胞－生殖細胞の発生分化とゲノム－エピゲノム制御機構の特性解明、またその理解に基づく細胞－ゲノムの人為操作の技術基盤の創出を目指し、分子生物学、生化学、遺伝学、オミクス解析、また新たな実験系の開発を併せて研究を進めている。

(1) 生殖顆粒構成分子によるレトロトランスポゾン抑制とゲノム保護：生殖細胞に顕著に観察される構造的特徴に生殖顆粒 RNP 構造が挙げられる。我々はマウス生殖顆粒の特異的な構成分子をコードする tudor 関連 Tdrd 遺伝子群の機能解析を進めている。Tdrd1, 6, 7, 9 ノックアウトマウスを作製した所、これら遺伝子のホモ欠損個体はいずれも雄生殖細胞の分化に異常を示す事が明らかとなった。このうち TDRD1, 9 はマウス piwi ファミリー MILI, MIWI2 と相互作用し、雄生殖幹細胞において piRNA 経路を介してレトロトランスポゾン LINE-1 の RNA、エピゲノムレベルでの抑制に機能する。生殖幹細胞の LINE-1 制御の破綻は減数分裂期で同レトロトランスポゾンの過剰発現を招き、ゲノム DNA 障害による広範な細胞死を誘起する。一方、TDRD6, 7 は精子細胞の半数体成熟に働く。Tdrd6, 7 ノックアウトマウスでは精子細胞に特徴的な生殖顆粒である chromatoid body の形成不全が観察されるが、Tdrd1, 9 とは異なりレトロトランスポゾンのエピゲノム制御の破綻は検出されない。Chromatoid body は体細胞の processing body, stress granule と分子構成が類似しており、現在 TDRD6, 7 と生殖細胞の RNA 制御、ストレス反応等について解析を進めている。(2) 減数分裂を制御する開始シグナルとクロマチン動態：幹細胞



哺乳類の生殖系列サイクルと多能性幹細胞  
The germline cycle and pluripotency in mammals

胞－生殖細胞サイクルにおいてゲノム情報の安定な継承は個体、種の成立に重要である一方、配偶子形成過程では減数分裂による1倍体化と相同遺伝子組換えによって遺伝情報の多様性が生まれる。減数分裂の制御機構の研究は主に酵母等の単細胞生物を用いて行われており、多細胞生物において詳細な分子基盤の解明は進んでいない。我々は精原幹細胞由来の樹立細胞株を用いて体細胞型増殖から第1減数分裂前期を誘導する実験条件を作出した。この培養実験系を用いて減数分裂を促進および抑制するシグナル経路を同定したので、分子から個体レベルでの詳細な研究を進めている。一方、クロマチン動態との関与が推測される遺伝子群を蛋白質ドメイン構造、発現パターン、進化的保存等によりゲノムデータベースからスクリーニングし、遺伝学的、生化学的解析を進めている。これらの研究により哺乳類の相同遺伝子組換えや半数体化を制御する分子基盤を明らかにし新たなゲノム操作技術への応用を目指す。(3)幹細胞ゲノム恒常性の分子ネットワーク：ES細胞のゲノム恒常性には幾つかの特徴的な性質が有る。ES細胞は明確な分裂寿命が認められずゲノム損傷によるG1チェックポイントが観察されない。ES細胞のDNA変異率は $10^{-6}$ 程度と見積もられており、他の体細胞の約 $10^{-4}$ と比べて約2桁程度低い。またES細胞のDSB修復は他の分化細胞と比べてHR経路がNHEJ経路よりも優位に利用される。更にES細胞の染色体不安定性のスペクトルは分化体細胞とは異なる。これらのES細胞と分化体細胞の相違はゲノム損傷応答の違いと考えられるがその分子機序は殆ど明らかになっていない。我々はゲノムワイドなマルチオミクス解析を徹底して行う事でES細胞のゲノム損傷に対する修復ダイナミクス、例えば損傷認識、クロマチン動態、シグナル伝達クロストーク等、の分子ネットワークの全体像を得る事を目指して研究を進めている。

The germline is the cell lineage that gives rise to full ontogenesis of individuals and transmits genetic information to next generations. During the differentiation of germ cells, important biological processes take place, such as epigenetic reprogramming, establishment of pluripotency and genetic DNA recombination. Our current research focuses on the molecular characterization of germinal granules/nuage, germline-specific ribonucleoprotein (RNP) assemblies in the cytoplasm, and the regulation of meiotic entry and chromatin dynamics.

One structural characteristic observed in the germline is a cytoplasmic RNP domain called germinal granules or nuage. The germinal granule/nuage is evolutionarily conserved in divergent animals, suggesting its essential and common role in the germline, but the precise molecular and physiological function(s) remains unclear. We are working on tudor-domain containing (Tdrd) genes, mainly Tdrd1, 6, 7 and 9, which encode for specific components of mammalian germinal granules/nuage. Gene-targeted disruption of Tdrd1, 6, 7 and 9 all led to male-specific sterility due to postnatal defects in spermatogenesis. Among these, TDRD1 and TDRD9 cooperate with piwi proteins, MILI and MIWI2, respectively, and function non-redundantly in retrotransposon silencing at RNA and epigenetic levels in spermatogonial stem cells and subsequent spermatogenesis. In contrast, Tdrd6 and 7 function in haploid spermiogenesis. Tdrd6 and 7 mutants show abnormal spermatid differentiation with aberrant chromatoid body architectures. Chromatoid bodies, a specialized form of germinal granules/nuage in spermatids, share some of their components with somatic processing bodies (p bodies), a form of RNP implicated in degradation or translational control of mRNA. We are addressing the possible function of TDRD6 and 7 in the regulation/metabolism of RNA.

Molecular mechanisms controlling meiotic entry and chromatin dynamics are important research subjects in cell and developmental biology. We previously showed that primordial germ cells autonomously enter into meiosis when cultured in vitro and identified a factor that suppresses this meiotic transition from mitosis. Recently, we established another in vitro culture system that induces meiosis initiation of an established germline stem cell line de-



rived from spermatogonia. By using this culture system, we identified signaling molecules that promote or inhibit meiosis from mitotic spermatogonial stem cells. We are undertaking biochemical and genetic characterization of these signaling pathways in vitro and in vivo.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Sakurai, K., Shimoji, M., Tahimic, C. G. T., Aiba, K., Kawase, E., Hasegawa, K., Amagai, Y., Suemori, H. and Nakatsuji, N. Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* Apr 38(7) (2010)
- Otsuji, T. G., Minami, I., Kurose, Y., Yamauchi, K., Tada, M., and Nakatsuji, N. Progressive maturation in contracting cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: Qualitative effects on electrophysiological responses to drugs. *Stem Cell Research* 4 201-213(2010)
- The International Stem Cell Initiative Consortium: Akopian, V., Andrews, P., Beil, S., Benvenisty, N., Brehm, J., Christie, M., Ford, A., Fox, V., Gokhale, P. J., Healy, L., Holm, F., Hovatta, O., Knowles, B. B., Ludwig, T. E., McKay, R. D. G., Miyazaki, T., Nakatsuji, N., Oh, S. K. W., Pera, M. F., Rossant, J., Stacey, G. N. and Suemori, H. Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 46 247-258(2010)
- Yamauchi, K., Sumi, T., Minami, I., Otsuji, T.G., Kawase, E., Nakatsuji, N. and Suemori, H. Cardiomyocytes develop from anterior primitive streak cells induced by  $\beta$ -catenin activation and the blockage of BMP signaling in hESCs. *Genes Cells* 15 1216-27 (2010)
- Tatsumi, R., Suzuki, Y., Sumi, T., Sone, M., Suemori, H. and Nakatsuji, N. Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2010 Dec 22
- Murakami, G., Inoue, H., Tsukita, K., Asai, Y., Amagai, Y., Aiba, K., Shimogawa, H., Uesugi, M., Nakatsuji, N. and Takahashi, R. Chemical library screening identifies a small molecule that 1 downregulates SOD1 transcription for drugs to treat ALS. *J. Biomolecular Screening* (2010 in press)
- Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H and Nakano T. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev* 24 887-892(2010)
- Toshiaki Watanabe, Shinichiro Chuma, Yasuhiro Yamamoto, Satomi Kuramochi-Miyagawa, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Yuko Hoki, Asao Fujiyama, Tatsuhiko Shibata, Takashi Sado, Toshiaki Noce, Toru Nakano, Norio Nakatsuji, Haifan Lin and Hiroyuki Sasaki. MitoPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline. *Genes Dev* (2010 in press)
- Yukihiro Yabuta, Hiroshi Ohta, Takaya Abe, Kazuki Kurimoto, Shinichiro Chuma and Mitunori Saitou. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly and spermiogenesis in mice. *J Cell Biol* (2010 in press)

## 2) 総 説

- Nakatsuji, N. Banking Human Pluripotent Stem Cell Lines for Clinical Application? J. Dental Res 89 757-758 (2010)
- Asai, Y., Tada, M., Otsuji, T. G. and Nakatsuji, N. Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system : An ideal hybrid model assay for drug development. Current Stem Cell Research & Therapy 5 227-232 (2010)
- Sengoku, S., Sumikura, K., Oki, T. and Nakatsuji, N. Redefining the concept of standardization for pluripotent stem cells. Stem Cell Reviews and Reports (2010 in press)
- 浅井康行, 饗庭一博, 中辻憲夫 : 多能性幹細胞を用いた創薬技術 BIO INDUSTRY 27 30-38 (2010)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- Shinichiro Chuma and Norio Nakatsuji. Germline tudor genes, germinal granules and spermatogenesis in mice. 特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」国際シンポジウム International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells (2010. 11.22-24. Fukuoka)
- 細川美穂子, 田中 敬, 林 瑛理, 篠原美都, 篠原隆司, 中辻憲夫, 中馬新一郎. マウス生殖幹細胞の減数分裂移行実験系作出の試み. 特定領域研究「生殖サイクル若手勉強会 2010」(2010. 7. 21-23. Tsukuba)

### 2) 講演・シンポジウム

- Nakatsuji, N.: Pluripotent stem cell lines for research and application in drug discovery. Roche 1st Mini-Symposium on Stem Cell Research (2010.6.15. San Francisco)
- Nakatsuji, N.: Human pluripotent stem cell lines as valuable tools for research and application. Jananes-German Presidents' Conference "Life Sciences Meet Natural Sciences : Crossing Borders" (2010.7.30. Heidelberg)
- Nakatsuji, N.: Human pluripotent stem cell lines for cell biology and drug discovery. 8th iCeMS International Symposium "Meso-Control of Functional Architectures" (2010.11.11. Kyoto)
- Nakatsuji, N.: Creation of neurodegenerative disease model cells by genetic modification of human pluripotent stem cell lines. Stem Cell Research : Opportunities and Risks (2010.11.20. Heidelberg)
- Nakatsuji, N.: Multi-disciplinary research and application of pluripotent stem cells for drug discovery and disease mechanism research. BIT' 3rd Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2010 (2010.12.6. Shanghai)
- 中辻憲夫 : ヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)株を活用した学際研究の最前線と創薬への応用. 2010 年度薬物動態談話会特別例会. 特別講演 (2010.11.5. 浜松)

## 再生誘導研究分野 Department of Stem Cell Biology

分野主任 教授 山中 伸弥

*Prof. Shinya Yamanaka*

### 【研究概要】

iPS細胞は体細胞に4つの転写因子(Oct3/4, Sox2, Klf4 および Myc)を導入することにより樹立される。iPS細胞は、遺伝子発現や試験管内での分化能のみならず、キメラマウスの生殖系列にも寄与し、胚性幹(Embryonic stem; ES)細胞とほぼ同じ性質を持っていることが示されている。また、患者由来のiPS細胞は病態解明、毒性解析などの再生医学に応用できると考えられる。しかし、樹立効率の低さやキメラマウスにおける腫瘍形成の問題があり、臨床応用へ用いるには不完全であった。

癌抑制遺伝子 p53 を機能抑制することでヒト iPS 細胞の樹立効率が上昇することが分かっていたが、そのメカニズムは不明であった。c-Myc を用いなくても p53 の欠失により初期化効率が 10% にまで上昇することを見いだした。プラスミドを用いた場合にも同様の上昇効果が認められた。また我々は低酸素条件で iPS 細胞の樹立効率が上昇することも発見した。これらの知見により樹立効率の低さの改善が進んだと考える。

樹立後の iPS 細胞は性質評価を行わなければならない。我々は様々な iPS 細胞から作った神経前駆細胞の腫瘍形成能の評価を行った。マウス線維芽細胞由来 iPS 細胞の腫瘍形成能は ES 細胞のそれと同様に低かった。しかし、生体組織由来細胞から樹立した iPS 細胞を用いた場合、高頻度で腫瘍形成が認められる場合があり、それは由来細胞に依存することが明らかとなった。このことから、iPS 細胞の樹立に用いる元の体細胞の選択が重要であることを明らかとした。

iPS 細胞を再生医療に展開する場合には異種成分を含まない培養系の確立が重要である。我々はヒト iPS 細胞を自己細胞フィーダー細胞を用いて樹立・維持することが可能であることを示した。このことは、自身の皮膚線維芽細胞が iPS 細胞のソースとしてだけでなく、フィーダー細胞としても有用であることを示しており、医療応用品質の iPS 細胞作製において重要な一歩であると考えられる。

様々な疾患由来 iPS 細胞の樹立を進めており、何種類かに関しては iPS 細胞の樹立に成功し性状解析を進めている。また、iPS 細胞からの分化細胞の作製にも着手しており、病態解明に向けて一連の解析系の確立を行っている。

(文責：中川)

iPS cells are generated by the transduction of four transcription factors, namely Oct3/4, Sox2, Klf4 and Myc. These iPS cells have been observed to notably contribute to adult chimera mice and also to their offspring through the germ line. Patient, or disease-specific iPS cells are therefore considered to potentially help elucidate the pathogenesis of diseases, while also being useful for drug screening, toxicology studies and regenerative medicine. However, some critical issues, such as their low efficiency and tumorigenicity, still remain to be overcome before the clinical application of iPS cells can be successfully achieved.

The knockdown of p53 (also known as TP53 in humans and Trp53 in mice) by short-interfering RNA (siRNA) has been recently shown to promote human iPS cell generation, but the specificity and mechanisms of this phe-

nomenon remain to be determined. We also previously reported that up to 10% of transduced mouse embryonic fibroblasts lacking p53 successfully transformed into iPS cells, even without the use of the Myc retrovirus. Such p53 deletion was also found to promote the induction of mouse iPS cells with plasmid transfection. The suppression of p53 also increased the efficiency of human iPS cell generation. We also showed that carrying out reprogramming under hypoxic conditions resulted in an improved efficiency for both mouse and human cells.

We evaluated the teratoma-forming propensity of the secondary neurospheres (SNS) generated from several mouse iPS cell lines. The teratoma-formation of SNS from embryonic fibroblast-derived iPS cells was similar to that of SNS from embryonic stem (ES) cells. In contrast, SNS from iPS cells derived from different adult tissues varied substantially in their teratoma-forming propensity, thereby correlating with the persistence of undifferentiated cells.

In order for iPS cells to be successfully applied for therapeutic usage, the establishment of a xeno-free culture is critical. We demonstrated that human iPS cells could be established and maintained on isogenic parental feeder cells. This finding suggests that autologous fibroblasts may therefore be useful, not only a source for iPS cells, but also as feeder layers. Our results therefore suggest that it may be possible to solve this dilemma by using isogenic fibroblasts as feeder layers for iPS cells. This is therefore considered to be an important step toward the establishment of clinical grade iPS cells.

We have already established some disease-specific iPS cells and characterized various clones. We have also initiated the preparation of differentiated cells from iPS cells. The next challenge thus remains to establish a new and effective analysis protocol which will be useful in the pathogenesis of various diseases. (文責：中川)

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Okita, K., Hong, H., Takahashi, K., and Yamanaka, S.: Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat. Protoc.* **5**(3): 418-428 (2010)
- Mizuno, Y., Chang, H., Umeda, K., Niwa, A., Iwasa, T., Awaya, T., Fukada, S.I., Yamamoto, H., Yamanaka, S., Nakahata, T., and Heike, T.: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J.* **24**(7): 2245-2253 (2010)
- Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Hiramatsu, K., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., Takehara, S., Higaki, K., Nakagawa, M., Takahashi, K., Yamanaka, S., Oshimura M.: Complete genetic correction of iPS cells from duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **18**(2): 386-393 (2010)

#### 2) 総説

- 山中伸弥：科学技術と事業仕分け. 住商総研 *Business EYE*. 2010 年春号 **1** (2010)
- 洪 炫禎, 沖田圭介, 高橋和利, 山中伸弥：iPS 細胞樹立を制御する p53 経路. *実験医学*. **28**(3): 378-382 (2010)
- 三浦恭子, 山中伸弥：iPS 細胞を用いた細胞移植治療の実現に向けて. *実験医学*. **8**(2): 159-165 (2010)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

中村直子, 佐伯久美子, 松山さと子, 高橋和利, 山中伸弥, 梅澤明弘, 湯尾 明: ヒト iPS 細胞からの無血清・無フィーダー培養による肝細胞分化. 第 9 回日本再生医療医学会総会(2010.3.19 広島)

丹羽 明, 斎藤 潤, 加藤 格, 大嶋宏一, 百瀬 大, 高橋和利, 末盛博文, 中辻憲夫, 山中伸弥, 平家俊男, 中畑龍俊: ヒト ES/iPS 細胞からの試験管内造血系を用いた分化過程の解析. 第 9 回日本再生医療医学会総会(2010.3.19 広島)

高橋和利, 與倉みどり, 岡田亜紀, 一阪朋子, 山中伸弥: ヒト iPS 細胞の安全性評価系. 第 9 回日本再生医療医学会総会(2010.3.19 広島)

岩淵久美子, 一阪朋子, 山中伸弥: マウス組織からの線維芽細胞樹立方法と培養条件による初期化効率の改善. 第 9 回日本再生医療医学会総会(2010.3.18 広島)

小柳三千代, 一阪朋子, 成田恵, 田邊剛士, 三浦恭子, 青井貴之, 沖田圭介, 高橋和利, 中川誠人, 山中伸弥: microRNA 発現プロファイリング iPS 細胞評価系への応用. 第 9 回日本再生医療医学会総会(2010.3.18 広島)  
※ポスター発表

前川桃子, 河村義史, 望月宏美, 五島直樹, 山中伸弥: ハイスループットスクリーニングによる新規多能性誘導因子の探索. 第 9 回日本再生医療医学会総会(2010.3.18 広島)※ポスター発表

大貫菜里, 山中伸弥: マウス人工多能性幹細胞の安全性予測. 第 9 回日本再生医療医学会総会(2010.3.18 広島)※ポスター発表

Egashira, T., Seki, T., Yuasa, S., Ohno, Y., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Kusumoto, D., Yae, K., Tanaka, T., Hattori, F., Aizawa, Y., Murata, M., Kimura, A., Yamanaka, S., Ogawa, S., Fukuda, K.: Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Healthy Volunteers and Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会(2010.3.7 京都)

Miki, K., Saito, A., Miyagawa, S., Uenaka, H., Shimzu, T., Okano, T., Yamanaka, S., Sawa, Y.: The Bioengineered Myocardium Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会(2010.3.7 京都)※ポスター発表

Seki, T., Egashira, T., Yuasa, S., Ohno, Y., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Kusumoto, D., Yae, K., Tanaka, T., Hattori, F., Kodou, K., Yamagishi, H., Murata, M., Yamanaka, S., Ogawa, S., Fukuda, K.: Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells from Patient with Familial Atrial/ Bentricular Septum Defect. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会(2010.3.6 京都)※ポスター発表

Ohno, Y., Yuasa, S., Egashira, T., Seki, T., Hashimoto, H., Tohyama, S., Arai, T., Tanaka, T., Hattori, F., Yae, K., Murata, M., Ogawa, S., Yamanaka, S., Fukuda, K.: Molecular Characterization of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell-derived Cardiomyocytes. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会(2010.3.6 京都)

Seki, T., Egashira, T., Yuasa, S., Ohno, Y., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Kusumoto, D., Yamanaka, K., Tanaka, T., Hattori, F., Aizawa, Y., Murata, M., Satou, T., Kanki, H., Yamanaka, S., Ogawa, S., Fukuda, K.: Generation of Induced Pluripotency Stem (iPS) Cells from Patients with Congenital Long QT Syndrome. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会(2010.3.5 京都)

田中孝之: レトロウイルスで作製した iPS 細胞における外来遺伝子の発見抑制と網羅的遺伝子発現. 第 6 回宮崎サ

イエンスキャンプ(2010.2.26-28 宮崎)※ポスター発表

大貫茉莉：iPS細胞の安全性に関する評価方法の探索. 再生医科学研究所 若手発表会(2010.2.4 京都)

## 2) 講演・シンポジウム

山中伸弥：「成長戦略」における科学技術のあり方,「自由民主党 成長戦略特命委員会」(2010.3.30 東京)

Yamanaka, S.: Induction of pluripotency by defined factors, 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (2010.3.29 Kyoto)

山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題,「第9回日本再生医療学会総会」(2010.3.19 広島)

山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題,「第83回日本薬理学会年会」(2010.3.17 大阪)

山中伸弥：Induction of pluripotency by defined factors,「第74回日本循環器学会総会・学術集会 真下記念講演」(2010.3.6 京都)

Yamanaka, S.: Induction of pluripotency by defined factors,「2010 Keystone Symposia Stem Cell Differentiation and Dedifferentiation」(2010.2.16 U.S.)

山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題,「社団法人神緑会講演」(2010.2.13 神戸)

山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題,「日本医師会生涯教育協力特別講演会」(2010.2.4 大阪)

山中伸弥：iPS細胞がつくる新しい医学,「大阪バイオサイエンス研究所主催・大阪市市民講演会」(2010.1.30 大阪)

山中伸弥：iPS細胞の可能性と課題,「大阪市立総合医療センターシンポジウム テーマ 都市型公的基幹病院が目指すべき研究とは ～臨床研究センター立ち上げに向けて」(2010.1.25 大阪)

山中伸弥：Induction of pluripotency by defined factors,「2010年ライフサイエンス国際シンポジウム「Future Outcome of Stem Cell Research Today」」(2010.1.18 U.S.)

Yamanaka, S.: Induction of pluripotency by defined factors,「Induced Pluripotent Stem Cells and the National Institutes of Health Intramural Research Program at NIH」(2010.1.15 U.S.)

Yamanaka, S.: Induction of pluripotency by defined factors,「National Institutes of Health Wednesday Afternoon Lecture Series」(2010.1.14 U.S.)

Yamanaka, S.: Induction of pluripotency by defined Factors,「University of Texas Southwestern Medical Center, Medical Scientist Training Program Lecture」(2010.1.13 U.S.)

## 再生増殖制御学分野 Department of Growth Regulation

分野主任 教授 瀬原(藤沢)淳子  
Prof. Atsuko Sehara (Fujisawa)

### 【研究概要】

我々は、発生・再生過程における細胞間相互作用とその制御機構、特に、発生後期の器官形成機構に焦点を当てた研究を行っている。ここでは現在進行中の5つの研究を取り上げる。骨格筋形成に着目した研究として、骨格筋幹細胞の分化とその制御機構の研究、筋細胞の融合機構の研究、また心臓形成や神経組織の形成に關与する増殖因子シグナリングや、増殖因子シグナリングや接着制御に關わる ADAM プロテアーゼに關する研究である。

#### Project1：骨格筋細胞分化機構とそれに基づく iPS 細胞分化法の確立(佐藤貴彦)

骨格筋幹細胞の起源は発生段階初期に遡る。胚発生中において骨格筋前駆細胞で発現する転写因子 Pax3、そして Pax3 を発現した後骨格筋へと運命決定された細胞である筋芽細胞で発現する転写因子 MyoD、この両者を発現する細胞群が骨格筋へと分化する集団かつ成体の組織幹細胞の源となることが示されている。そこで骨格筋幹細胞において発現する Pax3-GFP あるいは MyoD-RFP 蛍光発現マウスを用いて、①試験管培養可能な iPS 細胞を作成し、その蛍光発現を基に骨格筋へと分化可能な細胞群の効率的な収集／移植効果を評価することにより、iPS 細胞由来骨格筋幹細胞の自己複製能・分化能などを明らかにするとともに、②骨格筋系列細胞中で発現する miRNA の細胞分化カスケードにおける役割と機能を明らかにする。

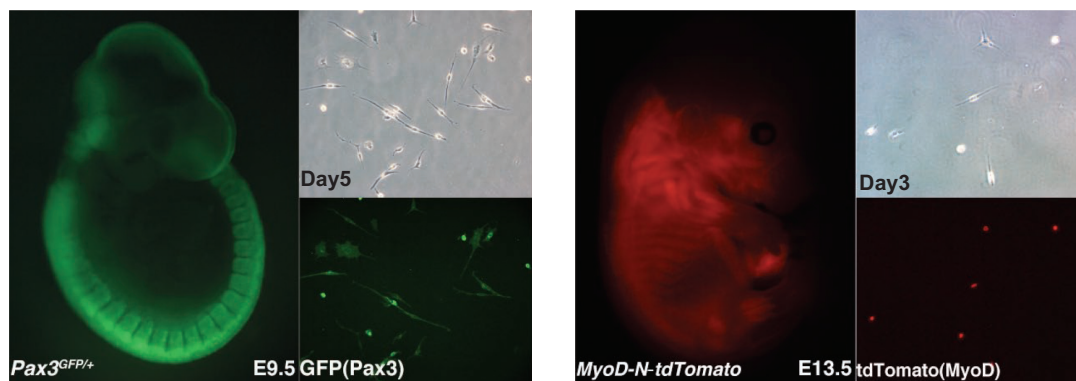


図1 Pax3-GFP および MyoD-RFP 発現マウス胚から FACs による細胞単離後、骨格筋への分化誘導

#### Project 2：筋形成機構に關する研究(栗崎知浩)

骨格筋は、多数の筋細胞同士が細胞膜融合を起こすことにより形成されるが、分子機構は不明である。私は、その分子機構の手がかりを得ることを目的として、融合活性を持つ細胞を特異的に認識する抗体をスクリーニングし、Yaksa と名付けたモノクローナル抗体を得た(図2)。Yaksa は細胞融合直前に細胞表層に出現する膜タンパク質を認識しており、Yaksa と反応する単核細胞は短時間のうちに細胞融合を起こした。この抗体を利用して筋細胞融合に關わる遺伝子群の同定に挑戦する。

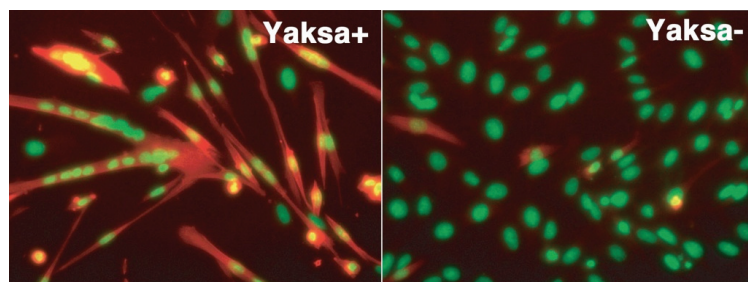


図2 抗体で分画した筋細胞の蛍光染色。赤： $\alpha$ アクチニン，緑：核(上)Yaksa結合筋細胞は6時間以内に融合するのに対し，(下)Yaksa非結合細胞は融合しない。

### Project3：神経細胞の産生を制御する増殖因子シグナルの機能解析(佐藤智美)

一方、形態形成を制御する細胞間シグナリングのモデル系のひとつとして、脳構築における ErbB シグナリングの役割について、ゼブラフィッシュを用いた研究を行っている。神経細胞の産生における増殖因子受容体 ErbB の新たな役割を知る目的で、中脳特異的プロモーター依存的に GFP が発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ *Tg(brn3a-hsp70:GFP)* 胚を ErbB 阻害剤で処理すると、中脳視蓋で GFP 陽性の神経細胞が消失することを見出した(図3)。この阻害剤処理は、神経前駆細胞の増殖や、神経細胞死には影響を与えず、神経前駆細胞から神経細胞の産生・分化を抑制することを明らかにした。

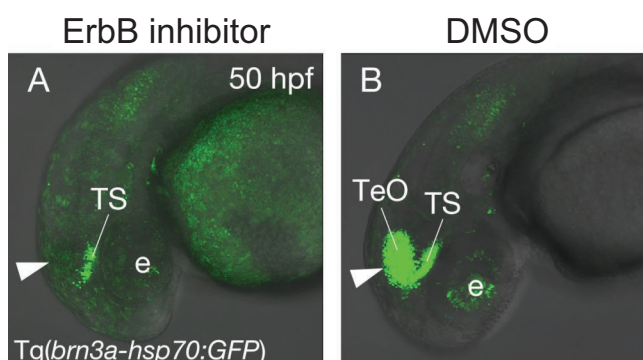


図3 ErbB 阻害剤処理による視蓋神経細胞の欠失  
受精後 52 時間の *Tg(brn3a-hsp70:GFP)* 系統胚で、GFP を発現する視蓋神経細胞が消失し(A, B; 白矢頭)、脳室が拡大していた。  
e：目、TeO：視蓋、TS：半円堤

### Project 4：神経組織形成におけるメルトリン $\beta$ /ADAM19 の役割と機能(佐藤文規)

我々は、発生・再生の制御に関与する ADAM プロテアーゼの働きに着目している。そのひとつメルトリン  $\beta$  は、ErbB レセプターのリガンドのひとつ、膜型グリア増殖因子の細胞外ドメインの切断活性があり、実際メルトリン  $\beta$  ノックアウトマウスの解析から、神経組織の末梢神経再生時のシュワン細胞(末梢神経系グリア)のミエリン形成に関与していることがわかった。このプロテオリシスの現場を捉えるべく、ミエリンを形成するシュワン

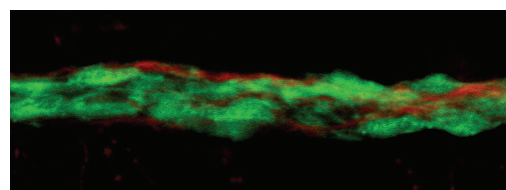


図4 ゼブラフィッシュの側線神経(赤)がシュワン細胞(緑)に囲まれつつある様子。

細胞を中心に側線という感覚器官全体を可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュ胚を用いて神経組織形成を観察し、メルトリン  $\beta$  の役割を生きた個体で示すことに成功した。この系において膜型グリア増殖因子の切断活性は、メルトリン  $\beta$  により空間的・時間的にどのように制御されているのか、そのプロテオリシスの意義を生きた個体を用いて解明する(国立遺伝学研究所の川上浩一先生との共同研究)。

### Project 5：血液循環開始における ADAM8 の役割と機能(飯田敦夫)

脊椎動物の発生において最初の赤血球は血管外で発生し、それが血管内へと移動後に血漿流に押し流される形で全身を循環する。それらは哺乳動物では母体内で進行するイベントであることから、その実体はこれまで殆ど知ら



れていなかった。我々は体外受精で発生する小型魚類ゼブラフィッシュを用いて、血液循環に至る過程を生きた個体で撮影することに成功した(図5)。現在までに、赤血球が血管内侵入の際に内皮細胞との接着を介して移動することや、膜型プロテアーゼ ADAM8 による赤血球-内皮細胞の接着解除が血液循環開始の引き金のひとつであることを報告した(Iida et al., 2010)。

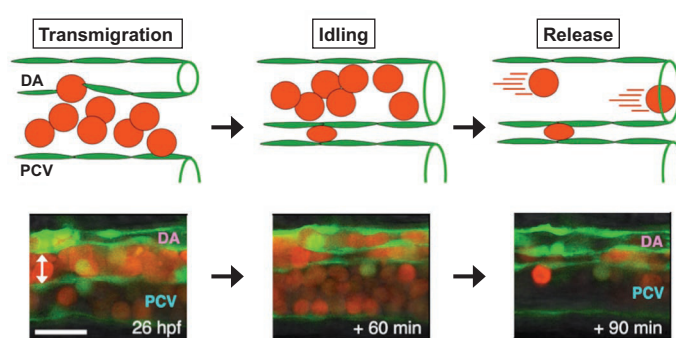


図5 血液循環開始の瞬間  
血管外で発生した赤血球が内皮細胞と相互作用しながら脈管内に侵入(Transmigration)し、接着を介した待機(Idling)状態を経て、プロテアーゼ依存的な接着解除(Release)の後に循環を開始する。DA=dorsal aorta, PCV=posterior cardinal vein, hpf=hours post-fertilization

(English)

We investigate cell-cell interactions during development and regeneration. We are currently taking various approaches to investigate cellular differentiation and morphogenesis during development. Mechanisms of Myogenesis

- (1) Mechanisms of skeletal muscle cell specification.
- (2) Mechanisms of muscle cell fusion

Regulation of Intercellular Signaling in Development and Regeneration

- (3) Roles of ErbB signaling in development and regeneration.
- (4) Roles of Meltrin beta/ADAM19 in development and regeneration
- (5) Roles of ADAM8 in development and regeneration

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Sunadome, K., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Kondoh, K., Sehara-Fujisawa, A., Nishida, E., ERK5 Regulates Muscle Cell Fusion through Klf Transcription Factors. *Dev. Cell, in Press*

Lagha M\*, Sato T\*, Regnault B, Cumano A, Zuniga A, Licht J, Relaix F, Buckingham M. "Transcriptome analyses based on genetic screens for Pax3 myogenic targets in the mouse embryo" *BMC Genomics* **11**, 696(2010)\*  
equally contributed

Sato T, Didier R, Marques L, Thorsteinsdottir S, Buckingham M. "A Pax3/Dmrt2/Myf5 Regulatory Cascade Functions at the Onset of Myogenesis" *PLoS Genetics* **6**, e1000897(2010)

Iida, A., Sakaguchi, K., Sato, K., Sakurai, H., Nishimura, D., Iwaki, A., Takeuchi, M., Kobayashi, M., Misaki, K., Yone-mura, S., Kawahara, A., and Sehara-Fujisawa, A.. Metalloprotease-Dependent Onset of Blood Circulation In Zebrafish. *Current Biol.*, **22** ; **20**(12): 1110-6.(2010)

#### 2) 総説

飯田敦夫, 瀬原淳子: ADAM8 による血液循環開始の制御, 特集「細胞外プロテオリシス研究の最前線」, 生化学,

Vol.82 No.10, 921-930. (2010)

飯田敦夫：生きた個体で観察する血球の起源，実験医学(羊土社)，Vol.29, No.1 (1月号)，55-56 (2011)

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

Atsuo Iida. Intravascular Proteolysis Triggers Synchronous Start of Blood Circulation in Zebrafish (胚発生における最初の血液循環にはメタロプロテアーゼによる細胞接着の解除が必要である)，CDB シンポジウム 2010 「Frontiers in Organogenesis」(2010.3.23-25 兵庫)

飯田敦夫，坂口和弥，佐藤洋旭，桜井英俊，西邨大吾，岩木彩，竹内美紀，小林麻己人，米村重信，川原敦雄，瀬原淳子：血液循環の始まりはメタロプロテアーゼに依存しておこる，ワークショップ「細胞接着・ECM・細胞間相互作用」(座長：橋本 隆，西村 智)，第 62 回日本細胞生物学会大会(2010.5.20 大阪)

Atsuo Iida, Kazuya Sakaguchi, Kiyooki Sato, Hidetoshi Sakurai, Daigo Nishimura, Aya Iwaki, Makoto Kobayashi, Shigenobu Yonemura, Atsuo Kawahara, and Atsuko Sehara-Fujisawa. Metalloprotease-Dependent Onset of Blood Circulation In Zebrafish. 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology (第 2 回日仏発生生物学会合同ミーティング) (2010.5.16 Paris, France)

Hidetoshi Sakurai, Yasuko Sakaguchi, Emi Shoji, Hiroshi Sakai, Kazunori Hanaoka and Atsuko Sehara-Fujisawa. Transplantation of mouse iPS cell-derived mesodermal progenitors improves structure and function of skeletal muscle in Duchenne Muscular Dystrophy model mice. ISSCR 8th Annual Meeting (2010.6.16 San Francisco, USA)

Atsuo Iida, Kazuya Sakaguchi, Daigo Nishimura, Kiyooki Sato, Aya Iwaki, Atsuo Kawahara, Atsuko Sehara-Fujisawa. Metalloprotease-Dependent Onset of Blood Circulation In Zebrafish (胚発生における最初の血液循環はプロテアーゼによる細胞接着の解除を必要とする)，Satellite Workshop 1: Morphogenesis: Growth and patterning, 43rd annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (第 43 回日本発生生物学会年会) (2010.6.20 京都)

Kazuya Sakaguchi, Tomomi Sato, Atsuo Iida, Naoki Irie, Akira Kakizuka, Atsuko Sehara. A comprehensive study on expression patterns of zebrafish ADAM genes (ゼブラフィッシュ ADAM 遺伝子の包括的発現解析)，43rd annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (第 43 回日本発生生物学会年会) (2010.6.21 京都)

Tomomi Sato, Kazuya Sakaguchi, Ryoma Tanigome, Fuminori Sato, Tomohiro Kurisaki, Atsuko Sehara. ErbB signaling involved in neurogenesis in the developing tectum in zebrafish (ErbB シグナル伝達は発生過程のゼブラフィッシュ視蓋における神経産生に關与する)，43rd annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (第 43 回日本発生生物学会年会) (2010.6.21 京都)

飯田敦夫，坂口和弥，西邨大吾，岩木 彩，瀬原淳子：発生における血液循環の開始には，ADAM プロテアーゼによる赤血球と血管内皮細胞の接着解除が必要である．第 15 回日本病態プロテアーゼ学会(2010.8.20 大阪)

西邨大吾，飯田敦夫，瀬原淳子：膜型プロテアーゼ ADAM8 はマクロファージ前駆細胞の分化を制御する，第 15 回日本病態プロテアーゼ学会(2010.8.20 大阪)

佐藤智美, 坂口和弥, 谷米竜馬, 佐藤文規, 栗崎知浩, 瀬原淳子: 発生過程のゼブラフィッシュ視蓋において神経細胞の産生に関わる増殖因子シグナリング, Oral Sessions 02-42「前駆細胞(Progenitor Cell)」(chairperson: 佐藤真), Neuro 2010(第33回日本神経科学大会, 第53回日本神経化学会大会, 第20回日本神経回路学会大会合同大会)(2010.9.3. 兵庫)

飯田敦夫, 坂口和弥, 西邨大吾, 岩木 彩, 瀬原淳子: ADAM8による血管内皮-赤血球の接着解除は初期発生での節間血管の伸長に必要である, 第16回小型魚類研究会(2010.9.18 埼玉)

Atsuo Iida. Metalloprotease-Dependent Onset of Blood Circulation in Zebrafish. Kyoto University Global COE "Centre for Frontier Medicine" International Symposium / Retreat 2010(2010.11.5. 兵庫)

Hiroshi Sakai. Isolation of skeletal muscle progenitors from mouse embryos and mouse iPS cells. Kyoto University Global COE "Centre for Frontier Medicine" International Symposium / Retreat 2010(2010.11.5. 兵庫)

Daigo Nishimura, Atsuo Iida, Atsuko Sehara-Fujisawa. Role of ADAM8 for macrophage differentiation and migration. Kyoto University Global COE "Centre for Frontier Medicine" International Symposium / Retreat 2010(2010.11.5. 兵庫)

Fuminori Sato, Tomomi Sato, Kazuya Sakaguchi, Akihiro Urasaki, Hironori Wada, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara. Roles of Meltrin b/ADAM19 in Schwann Cell Differentiation during Development of Peripheral Nervous System. Singapore Zebrafish Symposium 2010(2010.11.8. Singapore, Singapore)

佐藤智美, 坂口和弥, 谷米竜馬, 佐藤文規, 栗崎知浩, 瀬原淳子: 発生過程の視蓋において ErbB シグナル伝達は神経産生を始動させる (An ErbB signaling triggers neurogenesis in the developing tectum. ), BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会)(2010.12.8. 兵庫)

荒井宏行, 佐藤文規, 垣塚彰, 瀬原淳子: Meltrin $\beta$ (ADAM19)の心臓発生における役割(Roles of Meltrin-beta(ADAM19)in heart development), BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会)(2010.12.8. 兵庫)

佐藤文規, 佐藤智美, 坂口和弥, 浦崎明宏, 和田浩則, 川上浩一, 瀬原淳子: Zebrafish を用いた神経のミエリネーション可視化による膜型プロテアーゼ ADAM19 の機能の解明(Functional analyses of ADAM19 in myelination using zebrafish lateral line. ), BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会)(2010.12.8. 兵庫)

飯田敦夫, 坂口和弥, 西邨大吾, 岩木彩, 川原敦夫, 瀬原淳子: 膜型プロテアーゼ ADAM8 は赤血球-血管内皮の接着解除を介して, 脈管からの節間血管伸長を制御している (A Membrane-protease ADAM8 controls the extension of inter-segmental vessels due to the blood-vessel adhesion. ), BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会)(2010.12.8. 兵庫)

佐藤貴彦, 平向洋介, 瀬原淳子 "Pax3 を指標とした骨格筋幹細胞で発現する miRNA 探索" 精神・神経疾患研究開発 筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ武田研究班会議(2010.12.13. 東京)

## 2) 講演・シンポジウム

Atsuo Iida, Kazuya Sakaguchi, Kiyoaki Sato, Hidetoshi Sakurai, Yasuko Sakaguchi, Daigo Nishimura, Aya Iwaki, Atsuo Kawahara, and Atsuko Sehara. A Novel Role of ADAM Protease in Development. North American Vascular Biology Organization, Developmental Vascular Biology Workshop(2010.2.10-13 Monterey, USA)  
Sehara-Fujisawa, A. Metalloprotease-dependent onset of blood circulation. Japan-Israel Workshop on Stem Cells

(2010.2.23 Jerusalem, Israel)

瀬原淳子：発生におけるアダムプロテアーゼの新しい役割を見つける (Finding Novel Roles of ADAM Proteases in Development), シンポジウム「光るゼブラフィッシュが開く新しい解剖学」(オーガナイザー：川上浩一, 岡部正隆), 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2010.3.30 岩手)

瀬原淳子：ヘビ毒と ADAM プロテアーゼ, 生化学若い研究者の会 2010 年第 50 回夏の学校(2010.9.3. 神奈川)

Atsuko Sehara-Fujisawa. Metalloprotease-dependent regulation of nerve regeneration. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with Japanese Society of Developmental Biologists,(2010.8.5 Albuquerque, USA)

Atsuo Iida. Metalloprotease-Dependent Onset of Blood Circulation in Zebrafish. Singapore Zebrafish Symposium 2010(2010.11.8. Singapore, Singapore)

瀬原淳子：Roles of ADAM proteins in spatial and temporal regulation of ectodomain shedding events. シンポジウム「Ectodomain shedding biology-functional conversion of plasma membrane proteins-」, BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会合同大会)(2010.12.9. 兵庫)

## 再生免疫学分野 Department of Immunology

准教授 喜納 辰夫

Assoc. Prof. Tatsuo Kina

### 【研究概要】

本研究分野では、(1)マウス胸腺リンパ腫における T 細胞レセプター  $\beta$  鎖(TCR $\beta$ ) 遺伝子の再構成および(2)CD45 分子によるリンパ球活性化調節機構とその機能破綻による免疫異常の発生を主なテーマとして研究を行っている。

#### 1. マウス胸腺リンパ腫の TCR $\beta$ 遺伝子座の解析から、allele 間で V-DJ 再構成のおこるタイミングが従来受け入れられていたモデルとは異なることを示すデータを得た

マウス T 細胞レセプター  $\beta$  鎖(TCR $\beta$ ) 遺伝子の再構成は2段階で、まず両方の allele で D-J 再構成がおこり、次にどちらか一方の allele において V-DJ 再構成を開始するとされている。V-DJ 再構成で in-frame(VDJ<sup>+</sup>)になる確率は 1/3 なので、V-DJ 再構成を開始した細胞の 1/3 が VDJ<sup>+</sup>/DJ となる。残りの 2/3 の細胞では再構成の結果が out-of-frame(VDJ<sup>-</sup>)である。もしこれらの細胞すべてがもう一方の allele で V-DJ 再構成を始めるならば、2/9 の細胞が VDJ<sup>+</sup>/VDJ<sup>-</sup>となる。このとき全 allele に占める VDJ allele の割合は 70% になる。われわれがこれまでに TCR $\beta$  locus を調べた 33 の ENU で誘発したマウス胸腺リンパ腫(TL)における VDJ allele の割合は、71% であった。われわれは DJ allele が2種類存在することを示し(図)、もともと DJ(I)/DJ(I)であった TL における VDJ(I) allele の割合、DJ(II)/DJ(II)であった TL における VDJ(II) allele の割合を今回別々に求めた。その結果驚いたことに、VDJ(I) allele の割合は 81%、VDJ(II) allele の割合は 63% であった(表)。このことは、1. DJ(I)/DJ(I)であった一部の細胞では両方の allele で同時に V-DJ 再構成が開始されたこと、2. DJ(II)/DJ(II)であった細胞で最初の V-DJ 再構成が out-of-frame のものの一部はもう一方の allele で V-DJ 再構成がおこらず生き残らなかった、ことを反映している。

#### 2. CD45 における PTPase 活性低下と BALB/c.CD45.1 マウスにおける免疫異常発生の関係

CD45 は造血系細胞に特異的に発現される膜タンパク質であり、その細胞外ドメインに受容体構造を持つことが知られている。また、細胞質内にはチロシンリン酸特異的脱リン酸化酵素(PTPase)活性を有するドメインがあり、造血系細胞の発生や分化、リンパ球における抗原刺激後の活性化を調節する因子として重要であると考えられている。しかしながら、その幅広い機能やリンパ球活性化における詳細な役割、そのリガンドについてはいまだに未知の点が多い。BALB/c.CD45.1 マウスは、本研究室において、通常の BALB/c マウス(CD45.2)の CD45 遺伝子座を C57BL/6.CD45.1 の CD45 遺伝子座に置き換えて樹立したコンジュニック・マウスであるが、通常の BALB/c マウスと比較して、高頻度で、頭や背中 of 皮膚炎、アレルギー性結膜炎や中耳炎を発症することが認められ、遺伝的に免疫異常を発症しやすい性質を持つことが分かった。BALB/c.CD45.1 マウスにおけるこれらの免疫異常には、生体レベルでは Th2 サイトカインの亢進や IgE 産生異常が、細胞レベルでは T 細胞や B 細胞の活性化亢進が認められ、免疫異常の原因がリンパ球活性化機構の調節異常によると考えられた。リンパ球活性化に重要なシグナル伝達系分子の解析から、CD45.1 マウスでは、CD45.2 マウスに較べて、リンパ球表面の CD45 分子の PTPase 活性が年

D to J rearrangementの結果, 2種類のconstructsが生じる.  
DJ (I) and DJ (II)

それに続くV to DJ rearrangementにより, 合計3種類のconstructsが生じる.  
VDJ (I<sub>1</sub>), DVJ (I<sub>2</sub>) and VDJ (II)

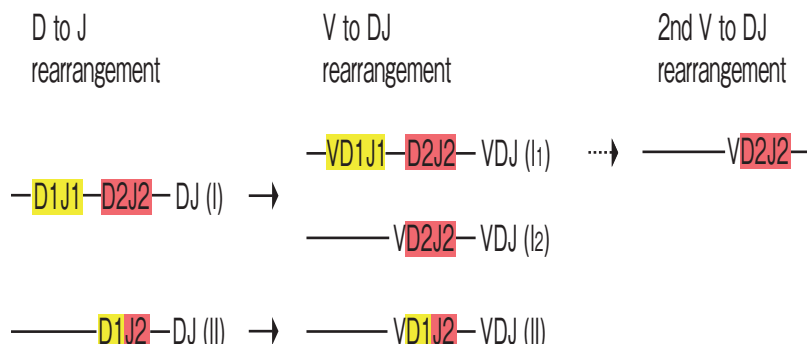


図 TCRβ locus の DJ allele と VDJ allele TCRβ 遺伝子において, 最初の D-J 再構成で 2 種類の DJ allele ができる. 次の V-DJ 再構成で, DJ (I) allele からは 2 種類, DJ (II) allele からは 1 種類の合計 3 種類の VDJ allele ができる.

V to DJ再構成がおこった割合は, X-ray TLで78%, ENU TLでは71%であった. ところが, DJ (I) / DJ (I), DJ (II) / DJ (II)それぞれからV to DJ再構成がおこった割合を計算すると,

	X-ray TL	ENU TL	αβ T cell
	78%	71%	72%
DJ (I) / DJ (I)	85%	81%	n. d.
DJ (II) / DJ (II)	59%	63%	n. d.

表 TCRβ 遺伝子再構成終了後次の分化段階へすすんだ細胞における VDJ allele の割合 αβ T cell についての従来のデータでは, VD2J2 と VD1J2 が区別されていなかった. そのために, V-DJ 再構成のおこりやすさが 2 種類の DJ allele で異なっているか否かの判定をすることができなかった.

齢とともに有意に低下していることが示され, CD45.1 マウスにおける免疫異常の原因が, リンパ球活性化の調節異常であることが示された. また, 抗 CD45 抗体を用いて T 細胞や B 細胞表面の CD45 分子を架橋すると, PTP 活性が顕著に低下することから, 細胞表面の CD45 分子のダイマー形成が CD45 分子そのものの PTPase 活性低下の原因になっていることが強く示唆され, CD45.1 マウスにおける免疫異常の主要な原因となっていることが考えられる. これらの結果は, CD45 分子が抗原刺激後のリンパ球活性化を正常にするために重要な役割を持ち, 過剰な免疫反応の持続を抑制して, アレルギーや自己免疫の発症を制御している重要な役割を担っていると考えられる.

Our research aim focuses on two areas. (1) Analysis of T cell receptor β chain (TCRβ) gene rearrangement in murine thymus and (2) Molecular mechanism of the control of lymphocyte function by CD45 in BALB/c.CD45.1 mouse model.

# 1. We have obtained new data that lead to modification of the long-standing model on TCRβ gene V to DJ rearrangement by analyzing TCRβ loci of murine thymic lymphomas.

T cell receptor β chain (TCRβ) gene rearrangement is ordered ; first, D to J rearrangement occurs on both alleles, second, it is assumed that one of the alleles initiates V to DJ rearrangement. One third of V-DJ rearrangements will be in-frame, giving rise to cells with TCRβ loci in the VDJ<sup>+</sup>/DJ configuration. In the remaining 2/3 cells,

the initial V-DJ rearrangements is out-of-frame. If all of these cells can undergo V to DJ rearrangement on the alternate allele, 1/3 of the subsequent rearrangements will be in-frame and therefore 2/9 cells will be with TCR $\beta$  loci in the VDJ<sup>+</sup>/VDJ- configuration. Thus, the maximum percentage of VDJ alleles in these cells will be 70%. Actually, the percentage of VDJ alleles from 33 ENU-induced thymic lymphomas (TLs) that we examined was 71%. As shown in Figure, DJ alleles are composed of two kinds of constructs: DJ (I) and DJ (II). We have separately calculated the percentage of VDJ (I) and VDJ (II) alleles in originally DJ (I)/DJ (I) and DJ (II)/DJ (II) TLs, respectively. Surprisingly, the percentage of VDJ (I) alleles was 81% and that of VDJ (II) alleles was 63% (Table). These data indicate that a part of DJ (I)/DJ (I) cells initiated V to DJ rearrangement on both alleles simultaneously, and that a part of DJ (II)/DJ (II) cells did not undergo V to DJ rearrangement on the alternate allele after the first non-productive rearrangement.

## 2. Decreased PTPase activity causes immune disease in CD45 in BALB/c.CD45.1 mouse

CD45 is a transmembrane protein that is specifically expressed in hematopoietic cells and is known to carry the receptor-type structures in the extra-membrane domains as well as the phosphotyrosine -specific phosphatase (PTPase) activities in its cytoplasmic domain. Although CD45 is considered to be important in the development/differentiation of hematopoietic cells and the control of lymphocyte activation after antigen stimulations, the wide variety of its functions as well as its ligand (s) are still unclear. The BALB/c.CD45.1 congenic mice which we established in our laboratory spontaneously develop atopic dermatitis in skins as well as allergic inflammatory diseases in eyes and ears after 6 months of age, and the occurrence of these disorders are depend upon the hyper production of Th2 cytokines and IgE in the blood. Biochemical analysis revealed that tyrosine phosphorylation of signaling molecules such as Jak3/Stat6 in lymphocytes in aged BALB/c.CD45.1 mice was significantly higher than that in normal BALB/c mice, suggesting that the disfunction of control mechanism of lymphocyte activation causes the diseases in BALB/c.CD45.1 mice. Because the activation of Jak3/Stat6 is indispensable for lymphocyte activation, and CD45 is involved in the regulation of Jak3/Stat6, our results suggest that PTPase activity of CD45 in aged BALB/c.CD45.1 lymph node B-cells is reduced as compared to normal BALB/c B-cells. Using the assay method to directly quantitate the PTP activity of CD45 molecules, we demonstrated that PTPase activity of CD45 molecules in aged BALB/c.CD45.1 mice was significantly lower than that in normal mice and the cross-linking of CD45 molecules in lymphocyte membrane caused the decreased PTPase activities of CD45, suggesting that disfunction of the control mechanism in lymphocyte functions might be involved in the occurrence of immune disorders in BALB/c.CD45.1 mice.

## 【業績目録】

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 学会・研究会発表

藤本真慈, 平野しのぶ, 柿沼志津子, 島田義也: Notch1 遺伝子 5' deletion から見たマウス胸腺リンパ腫の clonality.

Kyoto T Cell Conference 第 20 回学術集会 (2010.6.4-5. 京都)

柿沼志津子, 滝本美咲, 藤本真慈, 甘崎圭子, 鬼頭靖司, 大田有紀, 島田義也: Mlh1 欠損マウスのリンパ腫発生

における被ばく時年齢依存性. Kyoto T Cell Conference 第 20 回学術集会(2010.6.4-5. 京都)

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, KINA Tatsuo, SHIMADA Yoshiya: TCR $\beta$  chain loci in thymic lymphomas induced by X-ray irradiation have more rearranged VD2J2 constructs than those in ENU-induced thymic lymphomas. 14th International Congress of Immunology(2010.8.22-27. 神戸)

藤本真慈, 平野しのぶ, 柿沼志津子, 島田義也: Notch1 遺伝子 5' deletion 変異は必ずしもマウス胸腺リンパ腫の発がん原因ではない. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会(2010.12.7-10. 神戸)

藤本真慈: TCR $\beta$  鎖遺伝子で 2 種類ある DJ allele から V to DJ 再構成がおこる効率は同じではない. 京都大学再生医科学研究所平成 22 年度学術講演会(2010.12.13. 京都)



# 再生医学応用研究部門

## 生体修復応用分野 Department of Biological Repair

分野主任 准教授 高橋 淳

Assoc. Prof. Jun Takahashi

### 【研究概要】

我々は、胚性幹細胞(ES細胞)と人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた神経難病治療法開発を目指している。なかでも、胎児黒質細胞移植によって臨床経験が蓄積されているパーキンソン病を主な対象疾患として、ドーパミン産生神経の誘導、細胞移植による神経症状の改善に関する研究を行っている。この細胞移植療法においては、効率的な神経誘導、腫瘍形成抑制のための細胞選別、移植細胞の生存維持、長期効果と安全性の確認など検討すべき点が多々あり、現在はこれらをひとつひとつ解決している。将来的には、細胞移植や脳深部刺激療法などを含めた総合的な神経難病治療に繋げたいと考えている。

2010年はビデオ撮影によるカニクイザルの行動変化の定量化について報告した(図1)。Vigie Primate というソフトを用いて画面上のピクセル変化を運動変化量として捉え、20分間の自動運動量を解析した。MPTP投与によるパーキンソン病モデルでは正常カニクイザルと比べて自動運動量は88%減少。モデル間で比較すると、神経症状のスコア値と自動運動量との間に相関関係がみられた。また、ドーパミントランスポーター機能を反映する $^{11}\text{C}$ -CFT-PETの取り込みと自動運動量を比較検討すると、運動量の少ないモデルでは中脳における取り込み減少と相関関係がみられた。これらの結果はビデオによる自動運動定量化解析の有用性を示すとともに、線条体のみならず中脳におけるドーパミントランスポーター機能の重要性を示唆するものと考えられる。

We are developing a cell replacement therapy for the neurological disorders by using stem cells, especially embryonic stem cells (ES cells) and induced pluripotent stem cells (iPS cells). The main target is Parkinson's disease,

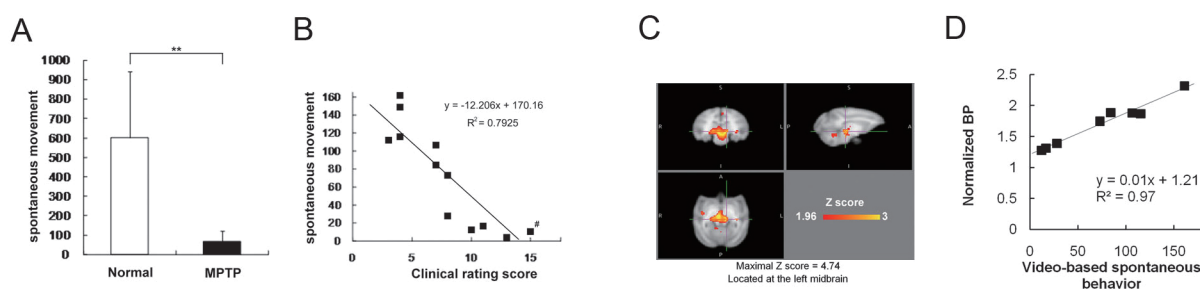


図1 (A) 正常とモデルサルにおける自動運動量. (B) モデルサルにおける自動運動と神経症状スコア値の相関関係. (C, D) モデルサルにおける $^{11}\text{C}$ -CFT 取り込みと自動運動の相関関係.

Fig. 1 (A, B) Correlation between neurological score and spontaneous movement.

(A) Spontaneous movement (pixel changes/66.67 msec) of normal and MPTP-treated monkeys. \*\* $p < 0.01$ .

(B) The plot of each sample.

(C, D) Correlation analysis of  $^{11}\text{C}$ -CFT binding potential (BP) with spontaneous movement

(C) Voxel-based statistical results of correlation with spontaneous movement. Significant cluster ( $Z > 2.3$ , corrected  $p < 0.05$ ) was found in the contrast of positive correlation with video-based spontaneous behavior. The maximal Z score was located in the left midbrain, close to the left substantia nigra (crosshair).

(D) The plot of the normalized BP values at the left midbrain voxel with the maximal Z score in C.

and our research focuses on induction of dopaminergic (DA) neurons from these cells and transplantation of the cells into the brain to improve neurological symptoms. So far, we have demonstrated that transplantation of monkey ES cell-derived neurons improved the Parkinsonian symptoms of the monkey models. In addition, we have revealed a method to prevent tumor formation. Now, we are inducing DA neurons from human ES and iPS cells, and developing a safe and efficient method for clinical application of these cells.

In 2010, we have reported a method for an unbiased evaluation of spontaneous movement of monkeys using a video-based analysis, in which the sizes of the movements were evaluated by the amount of pixels changes. The amount of spontaneous movement was significantly less (an 88% reduction) in the MPTP-treated monkeys compared to normal monkeys. Among MPTP-treated monkeys, the spontaneous movement was significantly correlated with the qualitative rating score. An unbiased assessment of DA transporter function by [ $^{11}\text{C}$ ]-CFT PET revealed a significant correlation between CFT binding in the midbrain and the amount of spontaneous movements. These results indicate that a video-based analysis can be a reliable tool for an objective and quantitative evaluation of motor dysfunction of MPTP-treated monkeys, and furthermore, that DAT function in the midbrain may also be important for the evaluation.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Morizane A, Darsalia V, Guloglu MO, Hjalt T, Carta M, Li JY, Brundin P. A simple method for large-scale generation of dopamine neurons from human embryonic stem cells. *J Neurosci Res* 88(16): 3467-78(2010)
- Anisimov SV, Morizane A, Correia AS. Risks and mechanisms of oncological disease following stem cell transplantation. *Stem Cell Rev and Rep* 6(3): 411-424(2010)
- Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially due to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Stroke*. 2010 ; 41 : 1798-1806(2010)
- Saiki H, Hayashi T, Takahashi R, Takahashi J. Objective and quantitative evaluation of motor function in a monkey model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 190(2): 198-204(2010)
- Uemura M, Refaat M. M, Shinoyama M, Hayashi H, Hashimoto N, Takahashi J. Matrigel supports survival and neuronal differentiation of grafted embryonic stem cell-derived neural precursor cells. *J Neurosci Res* 88(3): 542-551(2010)

#### 2) 著 書

- Asuka, M., Takahashi, J. : Embryonic stem cell transplantation for the treatment of Parkinson's disease. in *Perspectives of Stem Cells*. H. Ulrich(Ed. ) Springer, pp245-254(2010)

### 3) 総 説

高橋 淳：パーキンソン病の細胞移植治療は2012年までに実現するか？Frontiers in Parkinson Disease vol.3, No.2: 16-19(2010)

森実飛鳥, 高橋 淳：パーキンソン病に対する細胞移植治療－現在の到達点と今後の課題 実験医学増刊号 Vol.28 No.2: 201 (236)-107 (241) (2010)

---

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

森実飛鳥, 土井大輔, 菊地哲広, 高橋 淳：分子化合物を用いたヒト多能性幹細胞からの神経誘導. 第9回日本再生医療学会総会(2010.3.18 広島)

森実飛鳥, 菊地哲広, 吉川達也, 土井大輔, 高橋 淳：サル iPS 細胞からのドーパミン神経分化誘導. 神経組織の成長・再生・移植研究会第25回学術集会(2010.5.22 大阪)

Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Takahashi J.: Optimization of the protocol and cell line selection are important for generation of dopamine neurons from human induced pluripotent stem (iPS) cells. NeuroStemcell Workshop (2010.9.25 Mallorca, Spain)

Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Takahashi J.: Differences in neural differentiation propensity among cell lines of human pluripotent stem cells Neuroscience 2010 (2010.11.14, San Diego, California)

土井大輔, 菊地哲広, 森実飛鳥, 斎木英資, 高橋 淳：霊長類パーキンソン病モデルに対するヒト ES 細胞由来移植片の腫瘍源性 第9回日本再生医療学会総会(2010.3.18-19 広島)

土井大輔, 菊地哲広, 森実飛鳥, 高橋 淳：ヒト ES 細胞由来の神経細胞移植における霊長類パーキンソン病モデルでの腫瘍形成 第4回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (2010.10.8 京都)

Doi D, Kikuchi T, Morizane A, Takahashi J.: Sorting and transplantation of neural progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. Neuroscience 2010 (Society for neuroscience) (2010.11.15 San Diego, California)

菊地哲広, 森実飛鳥, 土井大輔, 高橋 淳：浮遊培養法によるヒト ES 及び iPS 細胞からの神経分化誘導 第9回日本再生医療学会総会(2010.3.18-19. 広島)

菊地哲広, 森実飛鳥, 土井大輔, 尾上浩隆, 林 拓也, 川崎俊之, 高橋 淳：パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植 第25回神経組織の成長・再生・移植研究会(2010.5.22. 大阪)

菊地哲広, 森実飛鳥, 土井大輔, 尾上浩隆, 林 拓也, 川崎俊之, 高橋 淳：パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植 第4回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (2010.10.7-9. 京都)

菊地哲広, 森実飛鳥, 土井大輔, 尾上浩隆, 林 拓也, 川崎俊之, 宮本 享, 高橋 淳：パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植 社団法人日本脳神経外科学会第69回学術総会 (2010.10.27-29. 福岡)

Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Saiki H, Takahashi J.: Transplantation of human iPS derived dopaminergic neurons to a primate model for Parkinson disease. Neuroscience 2010 (Society for Neuroscience) (2010.11.15. San Diego)

- Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially due to PPAR- $\gamma$  Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 35<sup>th</sup> Japanese Congress of Stroke (2010.4.16 morioka)
- Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially due to PPAR- $\gamma$  Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 51<sup>st</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Neurology (2010.5.20 Tokyo)
- Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially Due to Peroxisome Proliferator-Activated- $\gamma$  Activation in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 1<sup>st</sup> Annual Neuroscience Conference (2010.9.7. Nairobi, Kenya)
- Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially Due to Peroxisome Proliferator-Activated- $\gamma$  Activation in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (2010.9.19 Kobe)
- Washida K et al. Nifedipine, a calcium-channel blocker attenuates cognitive impairment and white matter damages in a mice with chronic cerebral hypoperfusion. Neuroscience 2010 (2010.11.15 San Diego)
- Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially Due to Peroxisome Proliferator-Activated- $\gamma$  Activation in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 2<sup>nd</sup> Kyoto Neuropathology Conference (2010.11.25 Kyoto)
- Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, and Takahashi R. Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially Due to Peroxisome Proliferator-Activated- $\gamma$  Activation in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. The 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism (2010.11.27 Osaka)
- 吉川達也, 小原洋志, 田畑泰彦, 高橋 淳: パーキンソン病に対する GDNF 徐放化生体吸収性ハイドロゲル脳内移植の効果. 第9回日本再生医療学会 (2010.3.19 広島)
- Yoshikawa T, Kohara H, Tabata, Y, Takahashi J.: Combined transplantation of fetal dopaminergic grafts and biodegradable gelatin hydrogel microspheres incorporating glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinsonian rats. Neuroscience 2010, 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience. (2010.11.13-17 San Diego, California)

## 2) 講演・シンポジウム

- 高橋 淳: 霊長類モデルを用いたパーキンソン病に対する幹細胞移植治療開発研究 第2回滋賀医科大学サルシンポジウム (2010.2.22 滋賀)
- 高橋 淳: 幹細胞脳内移植におけるバイオマトリクス 医工学フォーラム-2009年特別学術講演会- (2010.2.24 京都)

Takahashi J, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T.: ES cell treatment for Parkinson's disease The 13th International Conference : Peace through Mind Brain Science (2010.2.25 浜松)

高橋 淳：パーキンソン病に対する細胞移植療法の開発 第9回日本再生医療学会総会 (2010.3.18 広島)

高橋 淳：パーキンソン病に対するiPS細胞移植療法の開発研究 第47回日本臨床分子医学会学術集会 (2010.4.10-11 東京)

高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞移植治療の開発研究 神経組織の成長・再生・移植研究会第25回学術集会 (2010.5.22 大阪)

高橋 淳：パーキンソン病に対するiPS細胞移植療法の開発 第2回京大病院iPS細胞・再生医学研究会 (2010.7.23 京都)

Takahashi J : ES/iPS Cell Treatment for Parkinson's disease NeuroStemcell Workshop September 2010 (2010.10.26 Mallorca, Spain)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 シンポジウム「iPS細胞研究の最前線」(2010.10.2 東京)

Takahashi, J: ES/iPS Cell Treatment for Parkinson's disease 10th biennial meeting of APSN symposium (2010.10.17-19 Phuket, Thai)

## 組織再生応用分野 Department of Tissue Regeneration

分野主任 教授 戸口田 淳也

*Prof. Junya Toguchida*

### 【研究概要】

本研究分野の目標は間葉系組織の増殖分化機構を理解し、その成果にもとづいて、間葉系組織の臨床病態に対する新規治療法を開発することである。以下のテーマについて現在研究を遂行している。

#### 1. 間葉系幹細胞の増殖及び分化制御機構の解明

骨髄間質細胞中には、間葉系組織の様々な細胞に分化可能な組織幹細胞である間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) が存在しているとされている。しかし MSC の本態に関しては未解明な点が多く、MSC を用いた間葉系組織の再生医療を科学的根拠に基づいた医療とするためには、その理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科学教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行ってきた。増殖制御機構に関しては、細胞周期制御因子である p16 遺伝子の発現亢進が細胞老化を誘導し、増殖停止をもたらす主因であることを報告した。続いて低酸素環境での培養により、p16 遺伝子の発現亢進が阻害でき、細胞老化に至ることなく、かつ分化能を維持したまま長期間増殖を継続できること、更に低酸素により ERK の活性が阻害され、それが p16 遺伝子の発現亢進阻害の一因であることを見出した。分化制御に関しては、軟骨特異的遺伝子であるコンドロモデュリン I 遺伝子を材料として組織特異的発現の制御機構を解析してきた。その結果、間葉系組織を構成する細胞では少なくとも 3 種類の転写制御状態が存在することが判明した(図 1)。すなわち発現陽性細胞である軟骨細胞では H3K9 はアセチル化されており、ゲノムは非メチル化の状態 p300 及び Sp3 が結合している。一方、発現陰性の細胞の中で、骨芽細胞においては、YY1 及び HDAC2 の結合により H3K9 のアセチル化は阻害され二価メチル化されており、ゲノムも広範にメチル化されている。しかし同じ発現陰性細胞であっても脂肪細胞では、H3K9 は二価メチル化されているが、ゲノムはメチル化されていない。MSC もこの状態であり、分化関連遺伝子の発現が二段階に制御されていることが判明した。これらの結果は、MSC の分化能を規定する機構の解明に寄与し、MSC の本態解明への足がかりとなるものと考えている。

#### 2. 間葉系幹細胞の癌化監視機構の開発

癌の起源細胞が各組織に存在する組織幹細胞であることを示す報告が相次いでおり、MSC の場合、間葉系組織由来の腫瘍、すわなり肉腫の起源細胞になりうる。実際マウスのみならずヒト MSC においても、標準的な培養操作のみで *in vitro* 形質転換が生じることが示されており、MSC を用いた間葉系組織の再生医療の遂行に当たって無視できない状況になっている。我々は培養過程における癌化の初期変化としての p16 遺伝子のメチル化に注目し、実際に p16 遺伝子のメチル化が培養過程で発生し、それにより細胞の増殖能が亢進する場合があることを報告した。そこでこれらの結果に基づいて、パイサルファイト処理によるメチル化特異的 PCR 反応と遺伝子増幅定量法を組み合わせ、1 万個に 1 個のメチル化陽性細胞の混入を検定できる定量的メチル化測定法を開発し、MSC の標準的安全性評価法の一つとして、JIS に TR として申請した。

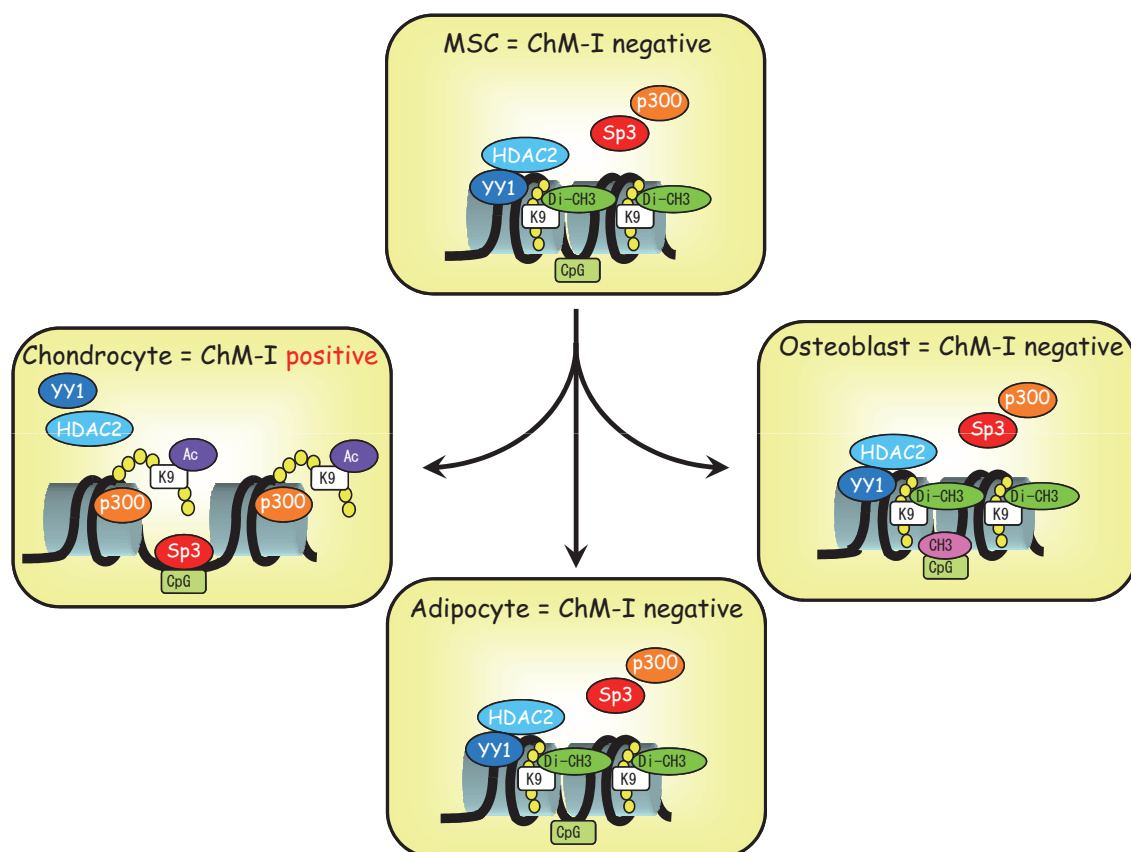


図 1. Chondromodulin-I (ChM-I) 遺伝子の組織特異的発現制御機構。間葉系細胞における ChM-I 遺伝子のプロモーター領域のゲノム及びエピゲノムの状態を表す。HDAC2, histone deacetylase 2; Di-CH3, dimethylation; Ac, acetylation; CH3, methylation; K9, 9th lysine residue of histone 3.

#### Figure legend

Figure 1. Regulatory mechanisms for tissue specific expression of the Chondromodulin-I (ChM-I) gene. Genomic and epigenomic status of the promoter region of the ChM-I gene in each mesenchymal cell was schematically demonstrated. HDAC2, histone deacetylase 2; Di-CH3, dimethylation; Ac, acetylation; CH3, methylation; K9, 9th lysine residue of histone 3.

### 3. MSC を用いた骨壊死病態に対する新規治療法の臨床応用

MSC を用いた再生医療の実践として、骨壊死病変に対する細胞移植治療法の開発に取り組んでいる。イヌを用いた基礎実験のデータに基づき、京都大学医学部附属病院内の分子細胞治療センターを使用する臨床治験を平成 18 年 9 月 1 日に施行された「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に基づいた臨床研究として京都大学医学部医の倫理委員会及び厚生労働大臣諮問委員会に申請し、平成 19 年 11 月 25 日国内初の承認を受けた。平成 20 年 2 月 5 日に第一例の治療を開始し、平成 21 年 12 月末までに 15 例の治療を施行した。大腿骨頭壊死症例 10 例に関しては全例術後 1 年経過時点の評価が終了し、良好な成績が得られており、その結果に基づいて、先進医療への申請を計画している。

### 4. 骨軟骨再生に対するプロスタノイド受容体作動性物質の応用

細胞を用いた再生医療と同時に、薬剤等による *in situ* での組織再生の探求も重要な課題である。我々は生理活性物質であるプロスタノイドに注目し、その受容体特異的作動薬の応用を検討してきた。プロスタグランジン E 2 受容体の中の EP2 受容体に特異的に作用するアゴニストにより、軟骨細胞の増殖が促進されることを報告し、この知見に基づいて家兎を用いた *in vivo* 治療実験を行った。まず骨軟骨欠損を作成し、修復過程に対する EP2 ア

ゴニストの作用を検討した。その結果、関節軟骨の修復が促進され、かつ正常な骨軟骨境界構造が構築され、長期に渡り関節構造が維持されることを見出した。続いて前十字靱帯切離及び内側半月板部分切除による外傷変性モデルを作成、直後より EP2 アゴニストを投与することで、その効果を検討したところ、Mankin score による評価により、変性予防作用を有することが判明した。免疫組織学的検索では、MMP-13 産生を抑制することで II 型コラーゲンの染色性が維持されていた。骨代謝に対する作用は、プロスタサイクリン受容体である IP 受容体作動薬を用いて解析しており、骨粗鬆症モデルラットにおいて骨量を改善することを見出している。これらの生理活性物質受容体特異的作動薬は、臨床応用が期待できる薬物であると考えている。

## 5. iPS 細胞に関する研究

平成 19 年 11 月に山中伸弥教授らによって樹立されたヒト iPS 細胞は、自家多能性幹細胞を用いた再生医療を可能とする画期的な細胞である。我々は平成 22 年 4 月 1 日に設立された京都大学 iPS 細胞研究所の一員として、iPS 細胞に関する研究を行っている。現在のテーマは、iPS 細胞からの間葉系細胞の誘導法の樹立、同一ドナーの異なる組織から樹立した iPS 細胞の組織依存性の検討及び骨軟骨関連難治性疾患患者から樹立された iPS 細胞を用いた病態解明と治療法の開発である。

(文責 戸口田淳也)

The major objectives of our department are to understand the basic biology of growth and differentiation of mesenchymal cells and to develop new therapeutic modalities for pathological conditions in mesenchymal tissues. Following projects are currently undertaken.

### 1. Regulation of growth and differentiation potential of mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells (MSC), which exist in bone marrow stromal tissues, have a potential to differentiate to cells of various types in mesenchymal tissues. However, many fundamental features of, are still unknown, which are crucial for the development of regeneration therapy using MSC as the evidence based medicine. In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs. As for the growth regulation, we found that increased expression of the p16 gene, which is a key regulator of cell cycle, was the main cause inducing the senescence and growth arrest of MSC. We also found that the hypoxic culture condition inhibited the upregulation of the p16 gene, and retained MSCs in the senescence-free state with multidirectional differentiation properties. We also found that hypoxia down-regulated the activity of ERK, which, at least in part, involved in the down-regulation of the p16 gene. As for the differentiation, we have analyzed the mechanisms to regulate the tissue-specific expression of a cartilage-specific gene, Chondromodulin-I (ChM-I). At least three different types of genomic and epigenomic statuses were found in mesenchymal cells (Fig. 1). In chondrocytes, which are positive for ChM-I, H3K9 was acetylated with the binding of p300, and promoter region was free from methylation allowing the binding of Sp3. Among ChM-I negative cells, osteoblasts showed the replacement of acetylated H3K9 with dimethylated H3K9 and extensive methylation in the promoter region. In contrast, the promoter region of the ChM-I gene in adipocytes, which are also ChM-I negative, was free from methylation, although H3K9 was dimethylated. MSC also showed this genomic and epigenomic status, indicating that tissue-specific expression was regulated by two steps, histone modification and DNA methylation. These results contributed to understand the molecular mechanisms of differentiation of MSC, which may help to disclose the nature of MSC.



## **2. Establishment of surveillance system for transformation of MSC**

Cancer cells are now considered to be derived from stem cells resided in each tissue, and therefore MSCs are potentially progenitors of malignant tumors developed in the mesenchymal tissues, sarcomas. There are a number of reports showing that not only murine but human MSCs could be transformed in vitro under standard culture condition. This issue should be seriously considered to promote the regenerative medicine in mesenchymal tissues using MSC. As one of important initial mutations, we have focused on the methylation of the p16 gene and found that the methylation of the p16 gene took place during the in vitro culture of MSC elongating the in vitro life. Based on these findings, we have established the methods to detect cells with methylated p16 gene by the combination bisulfite treatment and of methylation-specific quantitative PCR. Using this method we can detect one cell with methylated p16 gene among 10,000 normal cells. This method was submitted to JIS as technical report to evaluate the safety of MSCs.

## **3. Clinical trial of the new treatment for osteonecrosis using MSC.**

As the clinical application of MSC, we have engaged in the development of cell transplantation therapy for osteonecrosis. Based on the results obtained by the animal experiments using dogs, we established the protocol for the clinical trial in collaboration with Center for Cellular and Molecular Therapy in Kyoto University Hospital, which followed the guideline for the clinical trial using somatic stem cells issued by the the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) on September 1, 2006. After the examination of ethical committee of Kyoto University and MHLW, our protocol was approved on November 25, 2007, and the first case was registered on November 31, 2007. Since then 15 cases have been treated until the end of December 2010. All of 10 cases of femoral head necrosis were followed at least 12 months, showing satisfactory results. Based on the data of this intermediate evaluation, we are going to submit this method as an advanced therapy for MHLW.

## **4. Application of agonist for the PGE2 receptors for the articular cartilage repair**

In addition to the development of cell therapy, it is also important to develop the *in situ* treatment using drugs or small molecular materials. We have focused on prostanoids, which belong to physiological active materials, and applied receptor agonists for the regeneration therapy. First we focused on EP2, which is one of four types of prostaglandin E2 receptor, and reported that the agonist specific to EP2 stimulated the growth of mouse and human chondrocytes extracted from articular cartilage. Based on these results, we have performed the *in vivo* experiments using rabbits. At first, we created the osteochondral defects and investigated the effect of EP2 agonist for tissue regeneration. As a result, in combination with appropriate drug carriers, EP2 agonist enhanced the cartilage regeneration in vivo, and contributed to reconstruct the osteo-chondral boundary, which is important factor to maintain normal structure of articular cartilage. Next, we created traumatic degeneration model by the dissection of anterior cruciate ligament and partial resection of medial meniscus and investigated the preventive effect of EP2 agonist. We found that administration of EP2 agonist prevented the degeneration of articular cartilage determined by Mankin's scoring. Immunohistochemical analyses suggested that EP2 agonist inhibited the expression of MMP-13, which may contribute to maintain the type II collagen positive area. These receptor-specific agonists are promising molecules for clinical application.

## 5. Research related to iPS cells

Human iPS cells, which were established by Prof. Shinya Yamanaka on November 2007, are pluripotent stem cells enabling the regenerative medicine using patients' own cells. We have been engaging the research related to iPS cells as members in the Center for iPS Research and Application, Kyoto University, which was established on April 1, 2010. Current theme are ; the induction of mesenchymal cells from iPS cells, the origin-dependent characteristics of iPS cells established from different tissues of identical individuals, and the investigation of pathological mechanisms and the development of new therapy for intractable bone and cartilage diseases using patients-derived iPS cells.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

- Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **391** : 1471-6(2010)
- Jin Y, Shima Y, Furu M, Aoyama T, Nakamata T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Absence of oncogenic mutations of RAS family genes in soft tissue sarcomas of 100 Japanese patients. *Anticancer Res* **30**: 245-51 (2010)
- Ito K, Aoyama T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Jin Y, Nasu A, Ueda M, Kasai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Kobayashi A, Yoshida S, Niwa H, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. *Tissue Eng Part C Methods* **16** : 81-91 (2010)
- Aoyama T, Okamoto T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Ito K, Jin Y, Ueda M, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Histone modifiers, YY1 and p300, regulate the expression of cartilage-specific gene, chondromodulin-I, in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* **285** : 29842-50(2010)
- Nakayama R, Mitani S, Nakagawa T, Hasegawa T, Kawai A, Morioka H, Yabe H, Toyama Y, Ogoe A, Nakayama, T, Toguchida, J, Yoshida T, Ichikawa H. Gene Expression Profiling of Synovial Sarcoma : Distinct Signature of Poorly Differentiated Type. *Am J Surg Pathol* **34** : 1599-607(2010)
- Nishigaki T, Teramura Y, Nasu A, Takada K, Toguchida J, Iwata H. Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution. *Int J Dev Biol* (in press)
- 戸口田淳也. 間葉系幹細胞－疑問と期待に満ちた組織幹細胞. 実験医学増刊再生医療の最前線 2010 **28** :255-260 (2010)
- 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた骨壊死病態に対する新規治療法の開発. *Medical Bio* **7** : 32-33(2010)
- 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた骨壊死病態に対する新規治療法の開発. *臨床評価* **38** : 58-62(2010)
- 青山朋樹, 戸口田淳也. プロスタグランジン E2 受容体特異的作動薬. *整形外科*. **61** : 268(2010)
- 青山朋樹, 笠井泰成, 上田路子, 前川 平, 中村孝志, 戸口田淳也. 大腿骨頭無腐性壊死症に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床試験：細胞調製の安全性管理体制に関して. *再生医療* **9** : 25-3(2010)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

青山朋樹, 前川 平, 中村孝志, 戸口田淳也. 骨髄間葉系幹細胞を用いた骨壊死の治療. 第1回京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会(2010.1.15 京都)

早川和男, 伊藤錦哉, 青山朋樹, 加藤友久, 酒井芳紀, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也. OVX ラットモデルにおける, プロスタサイクリン受容体作動薬の骨芽細胞を介した骨形成促進作用に関する研究. 第9回日本再生医療学会総会(2010.3.19 広島)

青山朋樹, 中村孝志, 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた臨床応用. 第9回日本再生医療学会総会(2010.3.19 広島)  
河田紗耶架, 才田 聡, 田中篤志, 北 誠, 藤野寿典, 松原 央, 渡邊健一郎, 足立壮一, 仲俣岳晴, 中山富貴, 戸口田淳也, 溝脇尚志. 多発骨転移を伴った右腸骨原発 Ewing 肉腫の15才女児例. 第20回小児固形腫瘍研究会(2010.3.28 京都)

中山富貴, 仲俣岳晴, 柿木良介, 戸口田淳也, 渡邊健一郎, 足立壮一. 体外放射線照射骨と血管柄付腓骨で再建した9才女児大腿骨骨幹部骨肉腫の1例. 第20回小児固形腫瘍研究会(2010.3.28 京都)

戸口田淳也. 生検の方法. 第6回京整会若手整形外科研修会(2010.5.16 京都)

戸口田淳也. 悪性腫瘍手術と切除縁. 第6回京整会若手整形外科研修会(2010.5.16 京都)

戸口田淳也. 肉腫の分子生物学. 第83回日本整形外科学会学術総会(2010.5.28 東京)

戸口田淳也. 加藤友久, 中山富貴, 中村孝志. 肉腫幹細胞と癌幹細胞. 第51回日本臨床細胞学会総会(2010.5.31 横浜)

Toguchida J, Kasahara T, Yonghui J, Kato T, Nakayama T, Nakamura T. In vivo tumor forming-signature of human osteosarcoma cells revealed by genome-wide expression profiling. 8th ISSCR(2010.6.17 San Francisco)

Nasu A, Kato T, Tamaki S, Hayakawa K, Mitsui H, Sato S, Kobayashi K, Aoyama T, Takahashi K, Yamanaka S, Toguchida J. Comparison of human iPSCs generated with cells derived from a single donor but from different tissue origins. 8th ISSCR(2010.6.17 San Francisco)

Toguchida J. Cell-of-origin of sarcomas: insights from tissue stem cells. 第5回 International Symposium of Institute Network(2010.6.24 金沢)

中山富貴, 仲俣岳晴, 戸口田淳也, 坪山直生, 中村孝志. 粘液型脂肪肉腫転移検索における全身 MRI の有用性. 第43回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2010.7.15 東京)

佐藤信吾, 加藤友久, 松本誠一, 四宮謙一, 戸口田淳也. iPS 細胞を用いた肉腫発生機構解析システムの構築. 第43回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2010.7.15 東京)

笠原崇, 金 永輝, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也. 網羅的発癌解析からの骨肉腫造腫瘍能の探索. 第43回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2010.7.15 東京)

青山朋樹, 戸口田淳也. PGE2 受容体特異的作動薬を用いた関節軟骨再生. シンポジウム 第28回日本骨代謝学会学術集会(2010.7.21 東京)

青山朋樹, 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた難治性骨壊死疾患に対する臨床試験. 第17回 組織工学・再生医学ワークショップ(2010.9.18 神戸)

戸口田淳也. 癌化と再生の接点としての組織幹細胞. 第69回日本癌学会総会(2010.9.22 大阪)

- 長山 聡, 高橋 亮, 井元清哉, 布留守敏, 片桐豊雅, 中村祐輔, 戸口田淳也, 坂井義治. 大腸癌伸展における AFAP1L1 遺伝子の関与. 第 69 回日本癌学会総会(2010.9.24 大阪)
- Mitsui H, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Kasahara T, Hayakawa K, Kobayashi K, Maruyama T, Kanaji T, Fujimura S, Sugihara H, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. Prostaglandin E2 prevents the degeneration of articular cartilage via EP2 receptor in rabbit osteoarthritis model. 9th ICRS(2010.9.27 Barcelona)
- 戸口田淳也. 幹細胞を用いた再生医療の現況と展望. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会(2010.10.14 京都)
- 青山朋樹, 中村孝志, 前川 平, 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた骨壊死治療. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会(2010.10.14 京都)
- 三井裕人, 青山朋樹, 布留守敏, 伊藤錦哉, 笠原 崇, 早川和男, 小林恭介, 丸山隆幸, 金治敏也, 藤村心成, 杉原 光, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也. ウサギ変形性膝関節症モデルを用いたプロスタグランジン E2 受容体特異的作動薬の検証. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会(2010.10.14 京都)
- 那須 輝, 加藤友久, 玉置さくら, 早川和男, 三井裕人, 青山朋樹, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也. 同一ドナーの異なる組織から樹立した iPS 細胞の比較検討. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会(2010.10.15 京都)
- 戸口田淳也. がん化と再生医学の接点としての組織幹細胞. 第 39 回 SMTRC サルコーマセミナー(2010.10.24 東京)
- Tamaki S, Kajita Y, Kato T, Toguchida J. Genetic and epigenetic regulation of synovial sarcoma-associated molecule, FZD10. 16th CTOS(2010.11.13 Paris)
- Tamaki S, Kajita Y, Kato T, Toguchida J. Genetic and epigenetic regulation of synovial sarcoma-associated molecule, FZD10. 第 33 回日本分子生物学会年会(2010.12.9 神戸)
- 青山朋樹, 中村孝志, 前川 平, 戸口田淳也. 難治性骨壊死疾患に対する間葉系幹細胞を用いた臨床試験. 第 31 回日本臨床薬理学会年会(2010.12.1 京都)
- Nasu A, Kato T, Yamamoto T, Nakamura T, Toguchida J. Comparison of human iPSCs generated from different tissues of identical donors. 第 33 回日本分子生物学会年会(2010.12.10 神戸)
- 松本佳久, 那須 輝, 池谷 真, 戸口田淳也. iPS 細胞を用いた難治性骨疾患への取り組み. 京都大学再生医科学研究所学術講演会(2010.12.13 京都)
- 仲俣岳晴, 中山富貴, 戸口田淳也, 坪山直生. 成人軟部肉腫に対する化学療法の治療成績. 第 35 回近畿肉腫研究会(2010.12.18 京都)

## 2) 講演・シンポジウム

- 戸口田淳也. 幹細胞を用いた細胞治療の現状と展望. 第 28 回ニューセラミックス懇話会バイオ関連セラミックス分科会(2010.1.8 大阪)
- 戸口田淳也. 再生医療と肉腫に接点である間葉系幹細胞について. 第 239 回北九州整形外科医会(2010.1.29 北九州)
- 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を巡る話題. 平成 21 年度医工学フォーラム(2010.2.24 京都)
- 戸口田淳也. 細胞を用いた再生医療の現況と展望. 京都モーニングロータリークラブ例会(2010.3.11 京都)
- 戸口田淳也. 稀少疾病に対する iPS 細胞治療研究の現状と課題. 第 3 回 iPS 細胞産学合同研究会(2010.4.12 京都)
- 戸口田淳也. 幹細胞を用いた再生医療の実践と展望. 第 42 回滋賀県整形外科医会総会(2010.4.17 大津)
- 戸口田淳也. 細胞を用いた再生医療の現況と展望. 再生医療を考える会(2010.4.24 高松)

- 戸口田淳也. 肉腫の幹細胞. 第4回 SMTRC サルコーマセミナー(2010.5.6 大阪)
- 戸口田淳也. 間葉系幹細胞－肉腫研究と幹細胞研究の接点. 第39回サルコクラブ(2010.5.14 京都)
- 戸口田淳也. 遺伝子解析からみた骨軟部腫瘍の特徴. 第16回札幌整形外科研修セミナー(2010.6.12 札幌)
- 戸口田淳也. 幹細胞を用いた骨・関節疾患の病態解明と治療法開発. 京都整形外科医会(2010.7.24 京都)
- 戸口田淳也. 幹細胞研究の現況：間葉系幹細胞とiPS細胞. 第12回なにわ骨代謝・骨腫瘍研究会(2010.8.29 大阪)
- 戸口田淳也. iPS脂肪と再生医療－夢の治療実現に向けて. 第25回NPO法人再生医療推進センター講演会(2010.9.25 京都)
- 戸口田淳也. 幹細胞を用いた再生医療の現況と展望. 第36回京都医学会(2010.9.26 京都)
- 戸口田淳也. iPS細胞研究の現況と展望. 京都朱雀ロータリークラブ例会(2010.10.6 京都)
- 戸口田淳也. 幹細胞による再生医療－体性幹細胞からiPS細胞まで－. 三菱UFJ信託銀行経営者セミナー(2010.10.6 大阪)
- 戸口田淳也. 幹細胞を用いた再生医療－体性幹細胞からiPS細胞まで－. 第39回北野病院研究所セミナー(2010.10.19 大阪)
- 戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた再生医療の実践. 京都大学再生医科学研究所学術講演会(2010.12.13 京都)
- Toguchia J. Basic biology and clinical application of mesenchymal stem cells. Mahidol-Kyoto Universities International Symposium 2010(2010.12.16 Bangkok)

## 器官形成応用分野 Department of Organ Reconstruction

准教授 角 昭一郎

Assoc. Prof. Shoichiro Sumi

### 【研究概要】

本分野では、糖尿病の再生医療を中心的な研究テーマとしており、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。重症の糖尿病で、インスリン補充療法による血糖コントロールが困難な場合、膵臓や膵島の移植が適応となる。しかし、ドナー不足と永続的な免疫抑制という移植医療に共通の問題は避けられず、いつでも受けられる安全な治療法という理想からは大きな隔たりがある。また、低侵襲の移植医療として大きな期待を担ってきた膵島移植は、長期的な有効性に疑問が持たれるなどなお解決されるべき問題が多い。このような状況の中、糖尿病の再生医療には大きな期待が寄せられている。

膵島再生医療を実現する道筋としては、最も直接的に自己の膵島再生を促進する方法、自己または他者に由来する組織幹細胞あるいはES(胚性幹)細胞やiPS(人工多能性幹)細胞から膵島様細胞を分化誘導する方法、さらに、ヒト以外の異種動物の膵島を分離して利用する方法などが研究されている。しかし、自己由来の細胞ではなく、他者や異種の細胞を移植する場合には拒絶反応の対象となり、また、治療対象となる重症糖尿病の多くが自己免疫の関与する1型糖尿病であることを考慮すると、膵島や膵島様細胞を患者の免疫機構から保護する対策が必要である。本分野では、免疫隔離能を有する各種の半透膜やゲルで膵島や膵島様細胞を包んで拒絶反応を抑制することで、免疫抑制を行うことなく膵島移植と同等の治療効果が期待されるバイオ人工膵の研究を行っている。実際に、国外ではマイクロカプセル化膵島の腹腔内移植による糖尿病治療の臨床研究がすでに行われており、一定の成果をあげている。しかし、マイクロカプセル化膵島は一度移植すると完全に除去することが困難であり、この点で安全性に限界がある。

本分野では、ラットやブタの膵島分離法を確立し、これらを用いてマイクロカプセル化膵島の研究を行って来た。マイクロカプセル化膵島は、前述のマイクロカプセル化膵島とは対照的に、回収や交換が可能であり、臨床応用にはより有利と考えられる。過去には、メッシュ補強ポリビニルアルコール(PVA)バッグやポリスチレンスルホン酸混合アガロースゲルによるカプセル化など、各種のマクロデバイスの研究開発を行うとともに、あらかじめ血管誘導処置を施した皮下組織にこのようなデバイスを移植することで異種膵島による長期の血糖正常化が達成されることをマウス糖尿病モデルの治療実験で明らかにしてきた。近年では、イヌなど大型動物や最終的な目標であるヒトに応用可能な大型のバイオ人工膵を作製することをめざした新しい独自のバイオ人工膵作成技術として、膵島の凍結保存法と凍結によるPVAのゲル化を組み合わせた作製法を開発して、その有用性をマウスおよびラットの糖尿病モデルへの移植実験で確認している。即ち、膵島凍結保存液にPVAを溶解した粘性の高い溶液に膵島を浮遊させ、この液体をメッシュで補強してシート状に成形した後、凍結・溶解してゲル状のバイオ人工膵シートを作成する。この方法によれば、デバイスの面積や厚さを自由にコントロールすることが可能で、将来の大型化に大きく道を拓くものと考えている。

本年は、このPVAマイクロカプセル化膵島を用いてラットから重症糖尿病ラットへの同種同系および同種異系膵

島移植実験を行って、デバイスの効果と問題点を明らかにした。その結果、PVA マクロカプセル化によって、無処置の膵島移植では拒絶されるウイスター系からルイス系への移植であっても、拒絶の無いルイス系からルイス系への移植と同様に、次第に減弱はするものの最長 24 週間の高血糖是正効果が得られることを確認している。また、PVA マクロカプセル化膵島の作製過程で行う凍結操作の時間(通常 24 時間)を最長 30 日まで延長したものを作製して比較したところ、30 日凍結では若干の機能低下がみられるものの、十分に有意な移植効果が得られることを見いだした。この結果は、PVA マクロカプセル化膵島が他に例をみない凍結保存が可能なバイオ人工膵島であることを示しており、この点は、輸送・蓄積・品質管理などを可能にする大きな利点である。最近では、東北大学・後藤昌史教授と共同で、ブタ膵島を遠隔地から輸送し、これを PVA マクロカプセル化して治療に効用する研究を進めている。

膵島細胞は *in vitro* では増殖せず長期培養が困難であるが、高い増殖能を有する間葉系幹細胞と細胞融合させることで、より糖尿病治療に適した細胞を作製する研究に取り組み、電気的に細胞融合した細胞が *in vitro* で長期にインスリン分泌能を維持するとともに移植効果も良好であることを示唆する結果を得ている。さらに、鳥取大学・押村教授のグループと共同で、分化マーカーや薬剤耐性遺伝子を搭載したヒト人工染色体を ES あるいは iPS 細胞に導入し、これを  $\beta$  細胞に分化させることで糖尿病治療に応用する可能性を検討している。

Our final goal is to establish regenerative medicine for diabetes mellitus, which should be a safe and effective therapy available whenever and wherever required for a growing number of diabetes patients world-wide. In severely diabetic patients, pancreas or islet transplantation is indicated, if good control of blood glucose levels is not available. However, donor shortage and complications due to immunosuppressive therapy are inevitable problems of allo-transplantation. In addition, islet transplantation that drew attention as a promising curable treatment has become less attractive because of rather a short duration of insulin-free period after transplantation. Therefore, current transplantation therapies are still far from our dream. In such circumstances, much expectations are placed on regenerative medicine for diabetes mellitus.

In order to develop regenerative medicine for diabetes mellitus, there are several different approaches such as enhancement of patient's own islet regeneration, auto- or allo-geneic islet-like cells differentiated from somatic, embryonic or induced pluripotent stem cells *in vitro* and xeno-geneic islets isolated from the pancreas of animals e.g. pigs. However, as long as non-self cells are used and even autologous cells are used to type-1 diabetes that has autoimmune background, efficient immunosuppression should be required. In order to avoid it, we are diligently studying bio-artificial pancreas, in which islet cells are encapsulated by several kinds of semi-permeable membrane or hydrogel and thereby protected from host immune responses. In fact, clinical trial of micro-encapsulated porcine islets are ongoing in a few foreign countries, showing certain beneficial effects. However, micro-encapsulated islets do not allow complete retrieval, which may lower the safety level.

We have established isolation method of porcine pancreatic endocrine cells as well as rat islets. Using these islets, we have successfully shown the efficacy of several macro-devices of bio-artificial pancreas. In contrast to micro-encapsulation, macro-devices are retrievable and exchangeable, which is important advantage toward clinical application. In our past studies, mesh-reinforced polyvinyl alcohol (PVA) tube and bag, rod-shaped device of agarose containing polystyrene sulfonate, anti-complement substance, and so on were investigated in allo- and xeno-geneic situations. We have also shown that the subcutaneous site pretreated for angiogenesis can be successfully used for

transplantation site of these devices, leading to long-term normalization of blood glucose levels in diabetic mice. Recently we developed a novel method to make a sheet-shaped PVA-macroencapsulated islets by a combination of the freezing technique of islets and the phenomenon that PVA solution becomes gel by freezing and thawing. Briefly, islets are suspended in islet freezing solution containing PVA and this viscous solution is molded into a mesh-reinforced sheet and then frozen. This method enables us to make a device of any size with any shape that may be applicable to bigger animals and humans.

Using this macro-device, we recently examined this device in syn- and allo-geneic situations in rats and found that hyperglycemia can be improved as long as 24 weeks, although the effect gradually weakened, by PVA-macroencapsulated allo-geneic islets (Wistar to Lewis), as well as by PVA-macroencapsulated syngeneic islets (Lewis to Lewis). In addition, we prolonged the freezing duration in PVA-macroencapsulation processing up to 30 days and showed that these PVA-macroencapsulated islets of 30-day cryo-preservation show good function and significant effects after transplantation, although they are slightly less than 1-day or 7-day cryo-preserved ones. These results indicate that PVA-macroencapsulated islets are cryo-preservable bio-artificial pancreas that is unprecedented among other devices. This benefit allows easy shipping, accumulation and quality-control of the device, which is suitable for clinical usage. Recently, we are studying PVA-macroencapsulation of porcine islets that is shipped from Sendai in collaboration with Professor Masashi Goto of Tohoku University.

Other related researches are as follows. We have established a method of cell fusion between islet cells and mesenchymal stem cells and obtained results suggesting that such cells show persistent insulin-release *in vitro* and more efficient after transplantation. Furthermore, in collaboration with Professor Oshimura and his colleagues of Tottori University, we are studying beta-cell differentiation from ES and iPS cells to human artificial chromosome carrying several genes of differentiation markers and drug-resistance, toward diabetes therapy.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Sumi S. Regenerative medicine for insulin deficiency : creation of pancreatic islets and bioartificial pancreas. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 18 : 6-12, 2011. 2010 [Epub ahead of print]

Qi Z, Yamamoto C, Imori N, Kinukawa A, Yang KC, Yanai G, Ikenoue E, Shen Y, Shirouzu Y, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. Cell Transplant. (In press)

Yang KC, Wu CC, Qi Z, Chen JC, Sumi S, Lin FH. Comparison of bioartificial pancreas performance in the bone marrow cavity and intramuscular space. Archives of Medical Research 41 : 151-153, 2010.

Yang KC, Qi Z, Wu CC, Shirouzu Y, Lin FH, Yanai G, Sumi S. The cytoprotection of chitosan based hydrogels in xenogeneic islet transplantation : An in vivo study in streptozotocin-induced diabetic mouse. Biochem Biophys Res Commun. 393 : 818-823, 2010.

Qi Z, Shen Y, Yanai G, Yang K, Shirouzu Y, Hiura A, Sumi S. The in vivo performance of polyvinyl alcohol macro-encapsulated islets. Biomaterials. 31 : 4026-4031, 2010.



- Yang KC, Wu CC, Sumi S, Tseng CL, Wu YH, Kuo TF, Lin FH. Calcium phosphate cement chamber as an immunoin-solative device for bioartificial pancreas : In vitro and preliminary in vivo study. *Pancreas* 39 : 444-451, 2010.
- Yang KC, Wu CC, Lin SC, Sumi S, Lin FH. The in vivo performance of bioartificial pancreas in bone marrow cavity : A case report of a spontaneous diabetic feline. *Biochem Biophys Res Commun.* 393 : 362-364, 2010.
- Yang KC, Wu CC, Sumi S, Kuo TF, Lin SC, Lin FH. Intramedullary cavity as an implant site for bioartificial pancreas : An in vivo study on diabetic canine. *Transplantation.* 90 : 604-611, 2010.
- Yang KC, Wu CC, Kuo TF, Yang CA, Lin FH. Intramedullary cavity as an implanted site for bioartificial pancreas transplantation : A preliminary in vivo study. *Transplantation Proceedings* 42 : 2666-2668, 2010.
- Kuo TF, Lin HC, Yang KC, Lin FH, Chen MH, Wu CC, Chang HH. Bone marrow combined with dental bud cells promotes tooth regeneration in miniature pig model. *Artificial Organs.* 2010 [Epub ahead of print]
- Shirouzu Y, Ryschich E, Salnikova O, Kerkadze V, Schmidt J, Engelmann G. Rapamycin inhibits proliferation and migration of hepatoma cells in vitro. *J Surg Res* 159 : 705-713, 2010.
- Shirouzu Y, Sakurai K, Asonuma K, Inomata Y. Gastric volvulus as a complication in the recipients after adult living donor liver transplantation. *Surgery* 147 : 581-585, 2010.
- Shirouzu Y, Ohya Y, Suda H, Asonuma K, Inomata Y. Massive ascites after living donor liver transplantation with a right lobe graft larger than 0.8% of the recipient's body weight. *Clin Transplant.* 24 : 520-527, 2010.
- Shirouzu Y, Ohya Y, Hayashida S, Yoshii T, Asonuma K, Inomata Y. Reduction of left-lateral segment from living donors for liver transplantation in infants weighing less than 7 kg : Technical aspects and outcome. *Pediatr Transplant* 14 : 709-714, 2010.
- Shirouzu Y, Ohya Y, Hayashida S, Asonuma K, Inomata Y. Difficulty in sustaining hepatic outflow in left lobe but not right lobe living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2010 (in press).

## 2) 著書・総説

- 角 昭一郎. 各種の幹細胞と膵再生. *胆と膵* 31 (6): 541-546, 2010.
- 角 昭一郎. バイオ人工膵島. 特定非営利活動法人 日本 IDDM ネットワーク発行, 井上龍夫, 尾白登紀子, 神野友美編集, 1 型糖尿病 (IDDM) お役立ちマニュアル PART4 1 型糖尿病根治の道を拓く - 医療者 研究者 患者・家族 とともに -, p54-60, 2010.
- 角 昭一郎. 再生医療の最先端. (財) 建築保全センター発行, 「Re」166 (2010 年 4 月号) 号, 特集よみがえる/再生 p54-57, 2010.

---

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- 漆 智, 申 艶娜, 柳井伍一, 楊 凱強, 白水泰昌, 日裏彰人, 角昭一郎. Benefit of polyvinyl alcohol macro-encapsulated islets on islet cryopreservation. 第 37 回日本膵・膵島移植研究会. 2010 年 3 月 宇都宮市
- Yang KC, Qi Z, Yanai G, Sumi S. Chitosan Hydrogel as an Immunoin-solative Barrier for Xenogeneic Islet Transplantation. 第 37 回日本膵・膵島移植研究会. 2010 年 3 月 宇都宮市
- 漆 智, 申 艶娜, 柳井伍一, 楊 凱強, 白水泰昌, 日裏彰人, 角昭一郎. 膵島保存における PVA バイオ人工膵

の応用. 第9回日本再生医療学会総会. 2010年3月 広島市

楊 凱強, 林 峰輝, 漆 智, 郭 宗甫, 柳井伍一, 角 昭一郎. 人工臓の移植部位として的大腿骨腔の有用性:  
糖尿病犬における in vivo 実験. 第9回日本再生医療学会総会. 2010年3月 広島市

角 昭一郎, 楊 凱強, 柳井伍一, 白水泰昌, 漆 智. ポリビニルアルコール(PVA)マクロカプセル化臓島(MEIs)  
開発の現況. 第27回胆臓病態・生理研究会 2010年6月 弘前市

Sumi S, Yang KC, Qi Z, Shen Y, Yanai G, Shirouzu Y, Hiura A. Studies on poly(vinyl alcohol)-macro-Encapsulated  
islets for diabetes mellitus. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society Asia Pacific  
(TERMIS-AP)2010 Annual Conference. Sep. 2010, Sydney, Australia.

Yang KC, Wu CC, Kuo TF, Lin SC, Lin FH. Calcium Phosphate Cement Chamber as Immuno-isolative Device for  
Bioartificial Pancreas: An In Vivo Study on Diabetic Canine. Tissue Engineering & Regenerative Medicine  
International Society Asia Pacific (TERMIS-AP)2010 Annual Conference. Sep. 2010, Sydney, Australia.

Sumi S. Studies on poly(vinyl alcohol)-macro-encapsulated islets for diabetes therapy. 2010 International Sympo-  
sium of Materials on Regenerative Medicine (2010 ISOMRM). Nov. 2010, Zhunan, Taiwan.

## 2) 講演・シンポジウム

Sumi S. Studies on PVA-macroencapsulated islets. Japan-Taiwan Symposium on Nano-Medicine Research and Edu-  
cation. Jan. 2010, Kyoto, Japan.

角 昭一郎. 糖尿病治療の細胞資源－過去・現在・未来. 医工学フォーラム 2009年度特別学術講演会. 2010年2  
月 京都市

角 昭一郎. 再生医療について. 第48回日本癌治療学会学術集会シンポジウム 27 再生医療を応用したがん治療. 2010  
年10月 京都市

角 昭一郎. バイオ人工臓島の現状と展望. 第2回1型糖尿病臨床懇話会. 2010年10月 東京都.

## 臓器再建応用分野 Department of Bioartificial Organs

准教授 中村 達雄

Assoc. Prof. Tatsuo Nakamura

### 【研究概要】

臓器再建応用分野では、“*in situ* Tissue Engineering”の概念に基づいて再生医学を推進し、人類の幸福に貢献することを研究の第一目標にしています。これによって、未だ治療法がない症例や、或いは移植ドナー不足のため治療が受けられない患者さんが救われることを目指しています。さらに、再生医療が普及すると高騰を続けている医療費が抑制されることが期待されと考えています。

人間の体には、本来、再生能が備わっており、我々はそれらを引き出す新しい手法を開発しています。それが生体内再生 *in situ* Tissue Engineering です。すなわち、自己の細胞が増殖、分化できる適切な足場を体内に与えることによって、損傷を受けた自己の臓器が本来の構造と機能を再生出来るようにしています。研究の方法としては、再生医学の3つの柱である(1)足場、(2)細胞、(3)増殖・成長因子 を生体内で働かせる“*in situ* Tissue Engineering”という手法を独自に開発し、それを進めています。具体的には、同種・異種の臓器や組織から酵素処理で免疫原性を完全になくしたコラーゲンを抽出し、それを用いて作製した細胞外マトリックスや、或いは組織から細胞を完全に除去することにより作製した細胞外基質、さらには生体内で分解吸収される合成高分子を用い、それらに増殖因子などを除放させる DDS(薬物送達システム)を組み合わせることによって、欠落した組織や臓器が再生する枠組みを生体内に作ります。この枠組みを『足場』とし、生体内の幹細胞が増殖、分化することにより、自己の組織や臓器が再生復元されます。また、これらと平行して、iPS細胞や脂肪由来幹細胞を樹立・増殖させて組織再生に用いる研究や、瘢痕状になった細胞外マトリックスを融かして再び本来の性状に戻す研究も進めています。

現在行っている研究対象は下記のように分類されます。

- ①角膜、心膜、胸膜、腹膜、脳硬膜などの膜系
- ②血管、気管、喉頭、消化管などの管状臓器
- ③外力の加わる組織(骨、永久歯、歯根膜)
- ④末梢神経
- ⑤脊髄・大脳などの中枢神経系
- ⑥泌尿器系組織
- ⑦肺、腎臓、肝臓、甲状腺、上皮小体、脾臓などの実質性代謝臓器
- ⑧脂肪組織や筋肉組織、皮膚、その他軟組織
- ⑨人工臓器の開発や造影剤の研究
- ⑩手術器具・手術術式の研究
- ⑪バイオマテリアルの研究

当分野の研究の根幹概念は、細胞が増殖、再分化して、元の臓器を復元させる“場”(環境)を人工的に体の中に作れば、哺乳動物の臓器や組織も両生類のイモリのように再生復元させることが出来るというメカニズムを医学に応用するものです。このような“*in situ* Tissue Engineering”は世界に先駆けて我々が提唱してきた方法であり、

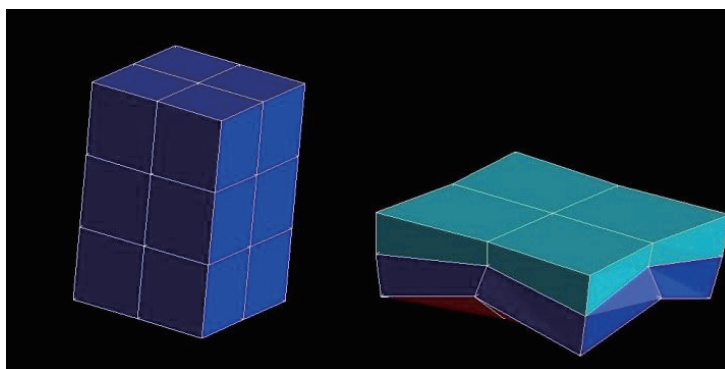
人工気管や人工神経などはすでに臨床応用され、これによって救われる患者さんの数も着々と増えてきています。この新しい技術は 21 世紀の医療の中心的柱になるものと考えています。

Title : Analysis of biological soft tissue (described by hyperelasticity) using finite element methods

There has been an analysis of mechanical properties of biological soft tissues treated from the continuum mechanical properties.

The models are formulated from the perspective of nonlinear solid mechanics and they are suited for a finite element method. Among some constitutive equations which belong to this boundary value problem, hyperelastic material is widely used. By using static finite element analysis, we try to find out the preferable model among many described constitutive equations including anisotropic materials

生体軟組織の力学的な解析に連続体力学が使われています。モデルは、非線形固体力学で定式化し有限要素法により解析されています。境界値問題の方程式の一つである構成式には、超弾性体がひろく用いられています。異方性を含んださまざまな超弾性体の構成式を、静的に有限要素法で解析中です。



Large deformation and distribution of hydrostatic pressure in a FEM model by compression examination of one axis (Isotropic incompressible hyperelastic material)

一軸圧縮試験の有限要素法による有限変形の様子と不定静水圧の分布 (非圧縮性等方性超弾性体モデル)

*In situ* Tissue Engineering: We have devised a completely new approach to the development of artificial organs. The main procedure using tissue engineering for tissues and internal organs involves the removal of the cell component from auto- or allo-organs to obtain only the extracellular matrix, so-called refined extracellular matrix (ECM) and reconstitutes the solid structure from the extracted collagen. This ECM or reconstituted structure is then employed as scaffolding, which after implantation into the patients is used for the regeneration or re-differentiation of tissue. Organs made of self-cells thus regenerate. Organs that regenerate in this manner not only possess highly differentiated tissue structures, but also show functional recovery, because all the cells are derived from the patients themselves. Whether or not our new method is practicable will depend mainly on the intrinsic regeneration capacity of each tissue. Up to now, in higher mammals including man, it has been believed that highly differentiated organs lose their ability to regenerate. We consider that mammals do not, in fact, lose this potential, and that the potential is hidden by excessively rapid wound healing around the failing tissues. In this sense, if we can provide good conditions using refined ECM, we can induce this hidden potential even in higher mammals. We have already carried out successful trials at regenerating peripheral nerves, the esophagus, the trachea, and blood

vessels with this method. A similar method is also applicable to other soft tissue organs such as the liver, heart, and lung, as well as the spinal cord. These results will be welcomed by patients who are dependent on palliative life-support systems, or transplantation candidates who are waiting for suitable donors. An additional benefit is that patients will be freed from the side effects of immunosuppressive drugs. The judgment of the brain death can then be discussed separately from the issue of transplantation, and will become a personal problem. Further more, this new approach help to reduce ever-expanding medical costs, which are in danger of destroying our health insurance system in the near future.

No study based on these concepts has ever been done either in Japan or abroad. In this sense, our pioneering work is expected to be a major area of medical science for the coming generation.

### Strategy and targets of our study

The target organs currently being considered for this development project are the heart, heart valves, esophagus, stomach, intestine, gallbladder, trachea, lung, liver, kidney, peripheral nerves, spinal cord, cornea, tendons, ligaments, cartilage, bone, fatty tissue, periodontal tissue, and permanent teeth. We plan to employ the two major methods as described below.

### ECM Method

To obtain the purified extracellular matrix, cell components are completely removed from homo or allo-organs. The solid structure is reconstituted from the ECM and extracted collagen. Growth factors are then applied to facilitate cell proliferation. Then this ECM-collagen-growth factor composite is implanted into the living body as a temporary scaffolding for new organ regeneration. Besides this, bioabsorbable materials will also be applied instead of purified ECM as a bulk structure for organ regeneration. Both extracted collagen and growth factors are should facilitate cell proliferation and cell redifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

### Cell+ECM Method

Cells (or living tissues) of patients are complexed (mixed) with purified ECM or bioabsorbable material. Using this complex, reconstruction of the failing tissues or organs will be attempted. Mesenchymal stem cell (MSC) obtained from the bone marrow is now applied to this method.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

中村達雄, 大森孝一, 金丸眞一: *in situ* Tissue Engineering を用いた気管・気管支の再建. 日本気管食道科学会会報 **61**: 89(2010)

中村達雄: 肺における再生医療. Clinical Engineering **22**: 32-36(2011)

中村達雄, 萩原明於, 稲田有史, 金丸眞一: 人工神経の基礎と臨床. Peripheral Nerve **21**: 192-196(2011)

Nakamura, T., Omori, K., Kanemaru, S.: The tissue-engineered airway and "in situ tissue engineering". Gen Thorac

Cardiovasc Surg (in press)

- Kanemaru, S., Hirano, S., Umeda, H., Yamashita, M., Suehiro, A., Nakamura, T., Maetani, T., Omori, K., Ito, J.: A tissue-engineering approach for stenosis of the trachea and/or cricoid. *Acta Otolaryngol Suppl.* **130**: 79-83 (2010)
- Imaizumi, M., Nomoto, Y., Sugino, T., Miyake, M., Wada, I., Nakamura, T., Omori, K.: Potential of induced pluripotent stem cells for the regeneration of the tracheal wall. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **119**: 697-703 (2010)
- Akazawa, Y., Ishida, T., Baba, A., Hiroma, T., Nakamura, T.: Intratracheal catheter suction removes the same volume of meconium with less impact on desaturation compared with meconium aspirator in meconium aspiration syndrome. *Early Hum Dev.* **86**: 499-502 (2010)
- Kobayashi, K., Suzuki, T., Nomoto, Y., Tada, Y., Miyake, M., Hazama, A., Wada, I., Nakamura, T., Omori, K.: A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. *Biomaterials.* **31**: 485-63 (2010)
- Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., Shigeno, K., Shionoya, Y., Nakamura, T.: Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Molecular Reproduction and Development* **77**: 2 (2010)
- Suehiro, A., Hirano, S., Kishimoto, Y., Rousseau, B., Nakamura, T., Ito, J.: Treatment of acute vocal fold scar with local injection of basic fibroblast growth factor: a canine study. *Acta Otolaryngol.* **130**: 844-50 (2010)
- 中嶋健太郎, 小林昭広, 甲田貴丸, 皆川のぞみ, 西澤祐吏, 西澤雄介, 伊藤雅昭, 杉藤正典, 小嶋基寛, 齋藤典男: 痔瘻瘤 15 例の臨床病理学的検討. *日本大腸肛門病学会雑誌* **63**: 346-358 (2010)
- 西澤祐吏, 伊藤雅昭, 甲田貴丸, 中嶋健太郎, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 腹腔鏡下直腸癌手術における前壁剥離の工夫. *臨床外科* **65**: 1581-1585 (2010)
- Saito, N., Suzuki, T., Tanaka, T., Sugito, M., Ito, M., Kobayashi, A., Nishizawa, Y., Minagawa, N., Nishizawa, Y., Watanabe, K.: Preliminary experience with bladder preservation for lower rectal cancers involving the lower urinary tract. *J Surg Oncol.* **102**: 778-783 (2010)
- 西澤祐吏, 伊藤雅昭, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 直腸癌に対する腹腔鏡下前方切除術における助手の役割. *日本内視鏡外科学会雑誌* **16** (2010)
- Nishizawa, Y., Saito, N., Ito, M., Sugito, M., Kobayashi, A., Nishizawa, Y.: Male sexual dysfunction after rectal cancer surgery. *Colorectal Dis.* **12**: 8-8 (2010)
- Honda, M., Hori, Y., Shionoya, Y., Nakada, A., Sato, T., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Nakamura, T.: Observation of the esophagus, pharynx and lingual root by gastrointestinal endoscopy with a percutaneous retrograde approach. *World J Gastrointest Endosc.* **16**: 288-292 (2010)
- Honda, M., Nakamura, T., Hori, Y., Shionoya, Y., Nakada, A., Sato, T., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Hashimoto, A., Hashimoto, Y.: Process of healing of mucosal defects in the esophagus after endoscopic mucosal resection: histological evaluation in a dog model. *Endoscopy.* **42**: 1-4 (2010)
- Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Sato, T., Nakamura, T.: Use of adipose-derived stromal cells for prevention of esophageal stricture after circumferential EMR in a canine model. *Gastrointestinal Endoscopy.* (in press)
- Hirasaki, Y., Fukunaga, M., Kidokoro, A., Hashimoto, A., Nakamura, T., Tsujimoto, H., Hagiwara, A.: Development

of a novel anti-adhesive material, alginate flakes, ex vivo and in vivo. Surg today (in press)

Yamashita, M., Kanemaru, S., Hirano, S., Umeda, H., Kitani, Y., Omori, K., Nakamura, T., Ito, J.: Glottal reconstruction with a tissue engineering technique using polypropylene mesh: a canine experiment. Ann Otol Rhinol Laryngol. **119**(2): 110-7(2010)

---

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会発表

中村達雄, 萩原明於, 稲田有史, 金丸眞一: 人工神経の基礎と臨床. 第21回末梢神経学会学術集会(2010.9.4 仙台)

稲田有史: PGA-C tube を中心とする生体内再生治療の四肢・口腔領域への応用. 第14回口腔顔面神経機能学会(2010.2.27 大阪)

稲田有史: 四肢外傷における末梢神経の再建. 第2回日本重度四肢外傷セミナー(2010.7.17-18 札幌)

稲田有史: 末梢神経に対する生体内再生治療. 第40回新潟神経学夏期セミナー(2010.8.5-7 新潟)

稲田有史: 運動器疼痛疾患への外科的治療の可能性についてー適応と限界ー. 第2回備後運動器疼痛疾患研究会(2010.9.25 福山)

塩谷伊毅, 砂田勝久, 中村達雄: アルコールブロック後のイヌ星状神経節の組織学的検討とホルネル徴候の変化. 第38回日本歯科麻酔学会総会・学術集会(ポスター)(2010.10.9 横須賀)

島田英徳, 中田顕, 橋本典也, 茂野啓示, 中村達雄: イヌ体細胞からのiPS細胞樹立. 日本再生医療学会(2010.3.18-19 広島)

Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., Shigeno, K., Nakamura, T.: Reprogramming of canine adult somatic cells to induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under hypoxic conditions. ISSCR(国際幹細胞学会)(2010.6.16-19 San Francisco)

Kojima T, The Protective Efficacy of Basic Fibroblast Growth Factor in Radiation Damaged Salivary Glands of Mouse. The 113th Annual Meeting of Triological Society(2010.4.30-5.1 USA)

Kojima T, Expression of side population cells during wound healing of rat vocal folds. ICALB and ICVPB(2010.7.6-8 USA)

Kojima F, Surgical Results of Pulmonary Angioplasty in Patients with Primary Lung Cancer, 24th Annual Meeting of European Association for Cardio-Thoracic Surgery(2010.9.13 Switzerland)

本多通孝, 堀 義生, 中村達雄, 山本一道, 中田 顕, 塩谷伊毅, 小林丈士, 島田英徳, 木田直樹: 脂肪由来幹細胞を用いた食道ESD後狭窄の予防. 第64回日本食道学会(2010.9.1 久留米)

本多通孝, 中村達雄, 山本一道, 堀義生, 中田 顕, 塩谷伊毅, 小林丈士, 島田英徳, 木田直樹: 食道内視鏡治療後の狭窄予防にステロイド, マイトマイシンCは有効か. 第18回日本消化器関連学会週間(2010. 10. 14 横浜)優秀演題賞受賞

Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Sato, T., Nakamura, T.: Transplantation of adipose-derived stromal cells prevent esophageal stricture after endoscopic mucosal resection in canine model. European Society for Artificial Organs 37<sup>th</sup> Congress(2010.9.10 Macedonia)

- Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Sato, T., Nakamura, T.: Autologous transplantation of adipose-derived stromal cells prevent esophageal stricture after endoscopic mucosal resection in a canine model. 第 63 回日本胸部外科学会(2010.10.26 大阪)
- 橋本典也, 島田英徳, 中田 顕, 塩谷伊毅, 茂野啓示, 中村達雄, 武田昭二: イヌ iPS 細胞を用いた歯周組織再生における細胞治療の基盤確立. 第 26 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い(2010.1.9 東京)
- 町口敏彦, 中村達雄: In vivo Glomerulogenesis from tubular epithelial cell or mesenchymal stem cell by conditioned media. 日本再生医療学会(2010.3.19 広島)
- 齋藤典男, 杉藤正典, 伊藤雅昭, 小林昭広, 西澤雄介, 西澤祐吏, 皆川のぞみ, 中嶋健太郎, 渡辺和宏, 甲田貴丸, 錦織英知, 神山篤史: 超低位直腸癌に対する ISR の適応に関する再検討. 第 110 回日本外科学会定期学術集会(2010.4.8-10 名古屋)
- 皆川のぞみ, 小嶋基寛, 伊藤雅昭, 杉藤正典, 小林昭広, 西澤雄介, 西澤祐吏, 中嶋健太郎, 渡辺和宏, 甲田貴丸, 錦織英知, 神山篤史: 内肛門括約筋切除術の病理組織学的剥離面陽性例と再発の検討. 第 110 回日本外科学会定期学術集会(2010.4.8-10 名古屋)
- 小林昭広, 齋藤典男, 杉藤正典, 伊藤雅昭, 西澤雄介, 西澤祐吏, 皆川のぞみ, 渡辺和宏, 中嶋健太郎, 甲田貴丸, 錦織英知: 側方郭清を伴う進行下部直腸癌手術例の予後再発に与える影響: 側方転移例と節外浸潤例の成績. 第 110 回日本外科学会定期学術集会(2010.4.8-10 名古屋)
- 渡辺和宏, 齋藤典男, 杉藤正典, 伊藤雅昭, 小林昭広, 西澤雄介, 西澤祐吏, 皆川のぞみ, 中嶋健太郎, 甲田貴丸, 神山篤史, 錦織英知, 萩原信悟: 大腸癌根治手術(R0)症例における肺転移の発生率・危険因子の検討. 第 110 回日本外科学会定期学術集会(2010.4.8-10 名古屋)
- 錦織英知, 伊藤雅昭, 西澤祐吏, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 直腸癌術後における肛門減圧ドレーンの検討. 第 64 回手術手技研究会(2010.5.21-22 大阪)
- 錦織英知, 伊藤雅昭, 小林信, 西澤祐吏, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 大腸癌術後 SSI 発症に関連する臨床因子の解析. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 小林昭広, 齋藤典男, 杉藤正典, 伊藤雅昭, 西澤雄介, 西澤祐吏, 皆川のぞみ, 中嶋健太郎, 甲田貴丸, 神山篤史: 切除可能骨盤内再発における術前治療の位置づけ. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 伊藤雅昭, 齋藤典男, 小林昭広, 西澤雄介, 杉藤正典, 西澤祐吏, 皆川のぞみ, 中嶋健太郎: 直腸・肛門管癌における Total ISR の治療成績. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 中嶋健太郎, 伊藤雅昭, 西澤祐吏, 甲田貴丸, 皆川のぞみ, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 下部直腸癌に対する簡便で定型化された腹腔鏡下手術手技. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 杉本元一, 杉藤正典, 西澤祐吏, 中嶋健太郎, 小林昭広, 伊藤雅昭, 齋藤典男: 直腸癌側方郭清後のリンパ漏についての検討. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 渡辺和宏, 齋藤典男, 杉藤正典, 伊藤雅昭, 小林昭広, 西澤雄介, 西澤祐吏, 皆川のぞみ, 中嶋健太郎, 甲田貴丸: 大腸癌根治術後の肺転移症例の特徴について. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 三宅 亮, 西澤祐吏, 西澤雄介, 小林昭広, 伊藤雅昭, 杉藤正典, 齋藤典男: 当院における原発性小腸癌 12 例の検討. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 西澤祐吏, 伊藤雅昭, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 治療成績向上と術後肛門機能の温存を目指した ISR 術前治療. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)
- 齋藤典男, 杉藤正典, 伊藤雅昭, 小林昭広, 西澤雄介, 西澤祐吏, 皆川のぞみ, 中嶋健太郎, 甲田貴丸: 下部尿路



浸潤を伴う下部直腸進行癌の再建手術. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)

錦織英知, 伊藤雅昭, 西澤祐吏, 神山篤史, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 大腸癌に対する局所切除術の検討. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)

西澤祐吏, 伊藤雅昭, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 直腸癌術後性機能障害の評価と治療. 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010.7.14-16 下関)

Nishizawa, Y., Saito, N., Ito, M., Sugito, M., Kobayashi, A., Nishizawa, Y.: The association between anal function and histological neural change after preoperative chemoradiotherapy followed by ISR. 15th Congress of the European Society of Surgical Oncology (ESSO) (2010.9.15-17 FRANCE)

Nishizawa, Y., Saito, N., Ito, M., Sugito, M., Kobayashi, A., Nishizawa, Y.: Male sexual dysfunction after rectal cancer surgery. 5th EUROPIAN SOCIETY OF COLOPRCTOLOGY (ESCP) (2010.9.15-17 Italy)

西澤祐吏, 伊藤雅昭, 中嶋健太郎, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 直腸癌に対する腹腔鏡下前方切除術の定形化と助手の役割. 第 23 回日本内視鏡外科学会総会(2010.10.18-20 横浜)

西澤祐吏, 伊藤雅昭, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: ISR 術前化学放射線療法の治療効果と術後肛門機能. 第 48 回日本癌治療学会学術集会(2010.10.28-30 京都)

杉本元一, 杉藤正典, 西澤祐吏, 中嶋健太郎, 西澤雄介, 小林昭広, 伊藤雅昭, 齋藤典男: 直腸癌側方郭清後のリンパ漏についての検討. 第 48 回日本癌治療学会学術集会(2010.10.28-30 京都)

西澤祐吏, 伊藤雅昭, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 直腸癌術後性機能障害における Sildenafil の治療効果. 第 48 回日本癌治療学会学術集会(2010.10.28-30 京都)

水野翔太, 河合俊和, 西澤祐吏, 中村達雄: ステッピングモータ脱腸減少を用いた生体組織の粘弾性推定. 第 19 回日本コンピュータ外科学会(2010.12.2-4 九州)

## 2) シンポジウム

本多通孝, 中田 顕, 中村達雄: 食道 ESD 後の創傷治癒過程と狭窄予防に対する再生医療の応用. シンポジウム「EMR, ESD の課題 安全確実な内視鏡医療の提供に向けて」第 18 回日本消化器関連学会週間(2010.10.15 横浜)

## 附属再生実験動物施設

### Laboratory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 長澤 丘司

*Acting Head, Prof. Takashi Nagasawa*

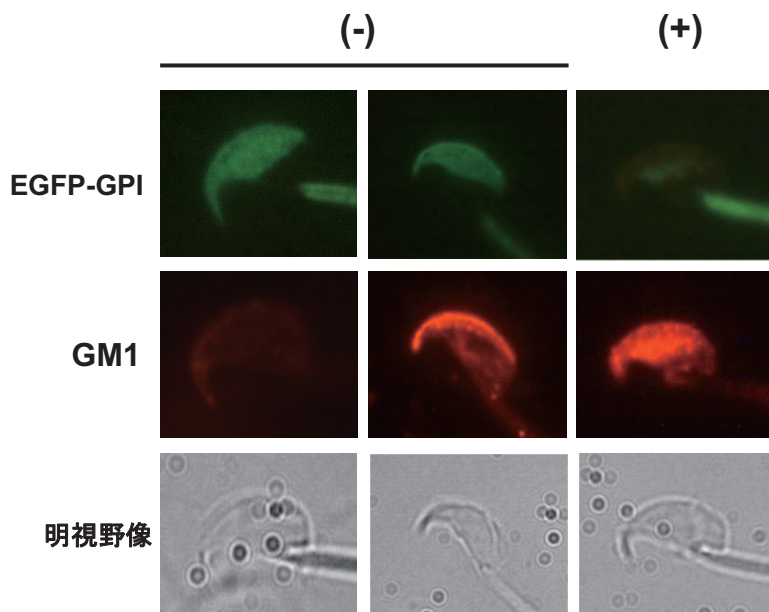
#### 【再生実験動物施設の現状について】

附属再生実験動物施設では、平成 21 年度イヌ；124 頭、サル；3 頭、ウサギ；17 羽、ラット；155 匹、マウス；14,159 匹が実験動物として飼養された(京都大学動物実験委員会「動物実験に関する自己点検・評価報告書」平成 22 年 7 月版による)。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を専任准教授 1 名・技術職員 2 名・非常勤職員 19 名で行っている。

当研究所で動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分の理解と配慮をして実施する事が大前提である。この原則を周知・徹底させるため、動物実験に従事する者は、動物実験に関する法規制・内規、動物実験実施にあたっての原則、実験動物の取り扱い方等についての全学講習および所内講習を受講することが義務付けられている。南部総合研究実験棟・動物飼育室を利用する者は、これに加えて、SPF(Specific Pathogen Free)マウスの取り扱いについて実地講習を受けなければならない。また、動物実験を実施するには、動物実験計画書を当研究所の動物実験委員会に提出し、厳格な審査を受け承認を得ることが必要である。

南部総合研究実験棟(2002 年 12 月設置、再生医科学研究所、ウイルス研究所、医学部の 3 部局による共同研究実験棟)マウス飼育室は稼動を開始してから 7 年が経過した。現在、SPF マウス飼育室全 16 室中、再生研；12 室、ウイルス研；3 室、医学部；1 室、を使用している。本マウス飼育棟では SPF マウスのみが飼育され、動物実験が行われている。搬入できるマウスは、指定実験動物供給業者から購入可能な SPF マウス及び当施設等において体外受精・受精卵移植によるクリーンアップを受け SPF 化されたマウスのみ限定されている。また、飼育室に持ち込む生物試料(細胞・血清等)も、事前に当施設による検疫を受けることが義務付けられた。これらの厳格なる管理の下、現在までのところ、感染事故等の深刻な問題は起きていない。ただ、共同実験棟マウス飼育室においては、SPF マウスの微生物汚染を防止するためには、動物飼育員、利用者各人の十分な注意が必要であるが、多数の人間が出入りする以上、いつ何時汚染事故が生じるかもしれない。不幸にして、幾つかの他校動物実験施設で微生物汚染事故が発生したことが報告されている。それらの苦い経験から、SPF マウスの微生物汚染の発生原因、汚染拡大様式、汚染除去法などを十分に学び、万一汚染が生じた時のことも想定し、汚染を最小限度に封じ込める等の対策について、本動物施設でも予め具体的な方策を立てておくことが必要であろう。一方、稼働し始めて明らかとなってきた設計、建築、設備上の種々の問題点、すなわち、室温・風量制御、凍結防止対策の不備等も徐々に把握されつつあり、対応可能になってきた。また、施設運営に関しても、3 部局共同の建物であるため、当初、運営・予算の執行における困難さが指摘されてきたが、試行錯誤ながらも克服されつつある。ただ、独立法人化後の運営交付金の削減により、安定した施設運営が困難になりつつあり、このような恒常的施設運営のための別枠の予算措置が講じられることを期待するものである。

東館動物施設は、副施設長による管理のもと、時代の要請に適合した飼育施設に変貌しつつある。すなわち、指紋認証制による利用者登録の導入、サル飼育室の改良、遺伝子改変動物飼育に適合したマウス・ラット室の改造等

methyl- $\beta$ -cyclodextrin

精子成熟誘導による GPI アンカー型 GFP の遊離とラフトマーカー GM1 の局在変化. methyl- $\beta$ -cyclodextrin 処理により精子頭部の GFP 蛍光が消失するとともに GM1 の特徴的な局在変化が見られた. このことから, 精子成熟と GPI アンカー型タンパク質遊離・GM1 局在変化との相関が示唆された. 精子尾部の蛍光はバックグラウンド.

である. また, イヌについても, 飼育数と出入の厳密なる把握により, スムーズな登録と狂犬病予防注射が可能になった. しかしながら, 施設・備品の老朽化が進行しつつあり, 問題発生時に, まさに自転車操業的に対応しているのが現状である. また, 毎年度予算的にも逼迫しており, このような対応がいつまで続けられるか予測不能である. 今後は, 大規模な改装を念頭においた施設運営が望まれる.

## 【研究概要】

再生実験動物施設は, 再生医科学研究所の附属施設として, 研究実施に不可欠である動物実験に関する全般的な管理業務(再生研の動物実験計画書の審査に関係する業務, 動物実験に関する講習会の開催, 再生研における実験動物の維持, 管理など)と共に, 一研究分野として以下の研究活動を行っている.

## 研究テーマ 1. GPI アンカー型タンパク質の代謝メカニズムと受精

現在の当研究室のメインテーマは, 膜結合タンパク質の一種であるグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型タンパク質(GPI-AP)の代謝メカニズムの解明とその生殖細胞系列での生物学的意義の探究である. このため, まず, 個体内での GPI-AP の局在を網羅的に解析するために, GPI アンカー型 GFP レポーター蛋白質(EGFP-GPI)を構築した. これを導入したトランスジェニックマウスでは, 予想以上に EGFP-GPI が, 外分泌腺や精巣において遊離していることを見出した(Kondoh G. et al. *FEBS lett.* 458, 299-303, 1999).

以後, この現象に特に着目し, マウス精巣生殖細胞より GPI-AP 遊離因子の精製・構造解析を行った. その結果, この因子のひとつとしてアンギオテンシン変換酵素(ACE)を単離した. すなわち, この酵素には, アンギオテンシン I やブラディキニンなどの昇圧ペプチドの活性を制御するのみならず, 多くの GPI-AP を細胞膜より遊離する新たな活性を持つことが明らかとなった. また, 今回同定した活性は, ジペプチジルカルボキシペプチダーゼとし

てこれらのペプチドを分解するための活性中心とは別の部位に位置し、また、GPI-AP のペプチド部分ではなく、GPI アンカーそのものを切断することも突き止めた。一方、ACE ノックアウトマウスでは、精子-透明体結合不全による雄性不妊が知られている。そこで、このマウスの精子をジペプチダーゼ不活性型 ACE で処理したところ受精能が回復した。このことから、ACE は *in vivo* で GPI-AP 遊離活性(GPIase)があり、この活性をもって受精に重要な役割を担っていることが示唆された(Kondoh G. et al. *Nat. Med.*, 11, 160-166, 2005)。また、GPI アンカーの生合成に関わる PGAP1 遺伝子ノックアウトマウスでも、ACE ノックアウトマウスと酷似の雄性不妊を示し、同じく精子膜上の GPI-AP が貯留傾向にある。これらのことから精子膜からの GPI-AP 遊離が精子の受精能獲得の重要なステップである可能性が示唆された。

そこで、本年度は、この過程を追跡する GPI アンカー型 GFP(EGFP-GPI) Tg マウスを用い、精子における GPI-AP 遊離と受精能獲得との相関を詳細に解析した。まず、精巣上体精子を採取し、精子成熟を誘導する methyl- $\beta$ -cyclodextrin を含む培養液で培養したところ、時間経過とともに蛍光の減衰が見られた。また、Hyal5, Prss21 などの内在性 GPI-AP も顕著に遊離した。このとき同時にラフトマーカである GM1 の局在を蛍光標識したコレラトキシン(CTB)で染色したところ、精子頭部膜ラフトの特異的な局在変化が見られた。次に、EGFP-GPI Tg マウスと野生型雌マウスを交尾させ、子宮内精子および卵管内精子を採取し同様に観察したところ、子宮内精子では EGFP-GPI は強く発現していたが、卵管内精子の約 40% で *in vitro* 培養で見られたのと同じ減衰が観察された。また、ACE ノックアウト EGFP-GPI Tg マウスの子宮内射出精子を同じく methyl- $\beta$ -cyclodextrin 存在下で培養しても、EGFP-GPI の減衰はみられなかった。さらに、卵管膨大部より卵を採取し、これと結合している精子を観察したところ、卵透明帯と結合している精子すべてで EGFP-GPI が減衰していた。これらのことから、精子は雌生殖路内を通過する過程でその一部が完全な受精能を獲得すること、同時にラフトの局在変化に関連した GPI-AP の遊離がおり、これらが卵透明帯との結合に不可欠であること、またこの過程は ACE により制御されていることが推察された。

## 研究テーマ 2. 遺伝子改変マウス作出技術の簡易化

遺伝子改変マウスの作出には、何段階ものプロセスが存在し、多くの時間・労力・経費を必要とする。なかでも特に問題になるのが、ターゲティングベクターの作製、ES 細胞の培養そしてキメラマウス作出の諸段階であろう。我々は、これらのステップにおける“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきた。ターゲティングベクターの作製においては、BAC クローンに基づく大腸菌内組み換えシステム(リコンビネーリング)を採用し、従来に比べて四分の一の時間短縮に成功した。また、キメラマウスの作出においては、凝集法を改良し、高価なインジェクション機器の購入や煩雑なメンテナンスのいらぬ方法を可能にした(Kondoh G. et al. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, Methods., 39, 137-142, 1999)。これらの技術集約のもとに、過去 6 年間で 17 件の遺伝子改変マウス作出に参加した。

Mammalian sperm acquire fertilization ability through multiple post-testicular processes. Serial important steps occur at the female reproductive tract, although the molecular mechanisms underlying this process remain unclear. To investigate the sperm membrane remodeling, we developed transgenic mouse lines carrying a new version of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored EGFP and traced the fate of this fluorescent protein during sperm process for acquiring fertility *in vitro* and *in vivo*. EGFP-GPI and other endogenous GPI-anchored proteins (GPI-AP) were released by methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD), a compound known to induce sperm capacitation by fa-

cilitating cholesterol efflux. In contrast, bovine serum albumin (BSA), another well-used reagent for inducing capacitation, alone could not induce EGFP-GPI release, but with following calcium ionophore treatment. This release of EGFP-GPI was closely linked to ganglioside GM1 and Izumo1 reorganizations in the sperm membrane, implying that the release of GPI-AP is closely associated with lipid raft mobility. Sperm ejaculated into the uterus strongly expressed EGFP-GPI in the head region, while subpopulations of sperm that migrated to the oviduct had lost fluorescence. The angiotensin-converting enzyme (ACE)-deficient sperm carrying EGFP-GPI were also treated with M- $\beta$ -CD, but neither shed EGFP-GPI nor reorganized GM1, implying the contribution of ACE in these processes. Moreover, EGFP-GPI-low sperm exclusively bound to the zona pellucida of eggs at the oviduct ampulla. These results suggested that sperm undergoing GPI-AP release associated with reorganization of lipid raft acquire fertilization potential.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

Omatsu, Y., T. Sugiyama, H. Kohara, **G. Kondoh**, N. . Fujii, K. Kohno, T. Nagasawa: The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33, 387-399 (2010).

---

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 学会・研究会発表

渡邊仁美, 折橋 郁, 近藤 玄: マウス精子における GPI アンカー型タンパク質遊離と受精能獲得との相関. 第 57 回日本実験動物学会, 2010.5.12~5.14, 京都市.

折橋 郁, 森田 隆, 東城 博雅, 近藤 玄: 新規 GPIase 活性を有する分子の同定. 第 33 回日本分子生物学会, 第 83 回日本生化学会合同大会 2010.12.7~12.10, 神戸市.

竹村 浩昌, 東城 博雅, 近藤 玄: 遺伝子改変マウスを用いたホスホリパーゼ B/リパーゼの生理的機能の解析. 第 33 回日本分子生物学会, 第 83 回日本生化学会合同大会, 2010.12.7~12.10, 神戸市.

Kondoh, G., Watanabe, H., Orihashi, H. Lipid raft mobility-associated GPI-anchored protein release for sperm capacitation in mouse. 11th International Symposium on Spermatology. (2010. 6. 24~6.29, Okinawa, Japan)

(文責: 近藤 玄)

# 附属幹細胞医学研究センター Stem Cell Research Center

## 霊長類胚性幹細胞研究領域 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research

分野主任 准教授 末盛 博文

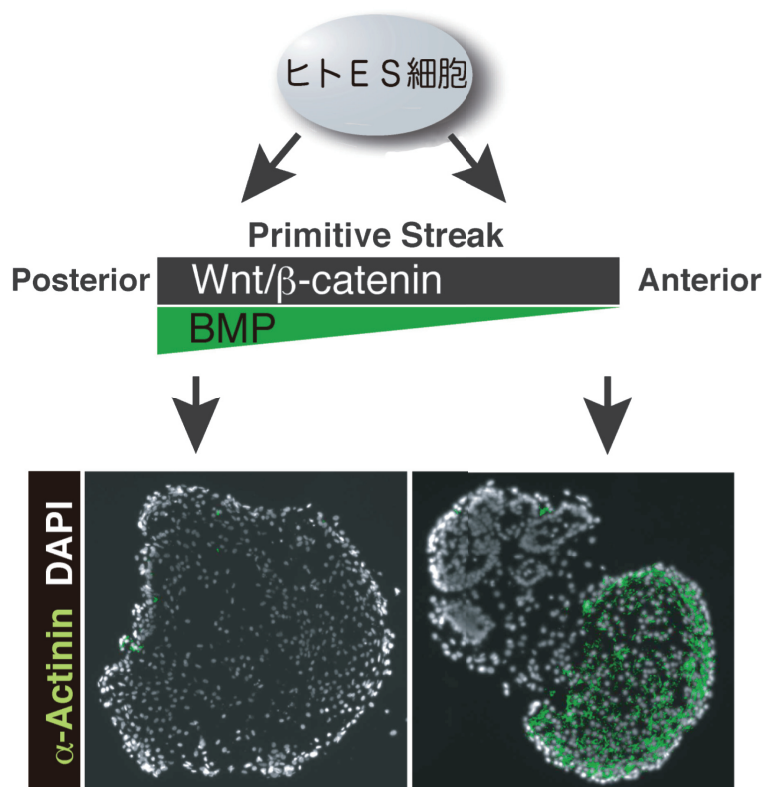
Assoc. Prof. Hirofumi Suemori

### 【研究概要】

#### ヒト ES 細胞株の樹立と特性解析

霊長類胚性幹細胞研究領域ではヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに 5 株のヒト ES 細胞株を樹立しうち 3 株は 2004 年 3 月から、2 株は 2009 年 4 月から分配を行っている。これまでに 50 件以上の研究計画に対して細胞株を分配し多くの研究成果が上げられている。

イギリス Sheffield 大学などの機関を中心とした International Stem Cell Initiative において、ヒト ES 細胞の医療応用に際して必要となる特性解析の標準化等が進められており、我々もこの共同研究に参加している。現在、ES 細胞の比較解析などより高精度に行うために、培養条件の標準化に向けての作業が行われている。



図：頭部側原始原条細胞からの心筋誘導

心筋を抗アクチニン抗体で染色した(緑)。β-catenin の活性化と BMP シグナルの抑制により誘導された頭部側原条から心筋が効率良くできていることがわかる。

### 正常な発生過程を模した分化誘導法によるヒト ES 細胞からの心筋作製

ヒト ES/iPS 細胞からの各種機能細胞の誘導は再生医療の実現に非常に重要な技術である。未分化細胞から作られる分化細胞は生体内の細胞と比較し機能が低い場合が多いことが問題とされているが、正常な発生過程を試験管内で再現することで、より機能が正常な組織細胞を作ることが可能とする考えが提唱されている。そこで、我々は正常発生に沿った心筋細胞の分化誘導システムの構築を試みた。心筋は発生初期に形成される原条の頭部側に由来することが知られている。我々はこれまでに、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路の活性化によってヒト ES 細胞が原条を構成する細胞へと分化し、さらに Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の活性化と同時に BMP シグナルを抑制することによって、頭部側原条が誘導されることを明らかにしている。本研究において、我々は、この方法で誘導した頭部側原条細胞が心筋細胞へ効率的に分化することを示した。心筋への分化誘導は頭部側原条細胞を BMP4 と FGF2 存在下で浮遊培養することにより行った。その結果、培養 5 日後にはほぼすべての細胞塊で拍動心筋細胞が観察された。心筋細胞マーカーであるアクチニン陽性細胞の割合は、細胞塊あたり約 30% であった。また、パッチクランプ法により、単一心筋細胞での活動電位も観察された。一方、頭部側への誘導を行わない原条細胞からは、心筋細胞はほとんど出現してこなかった。これらの結果は、正常発生に沿った頭部側原条領域の形成を経由した心筋細胞への分化誘導が、ヒト ES 細胞において可能であることを示している。この誘導法は、心筋細胞の発生、分化過程を培養下で再現できる興味深いモデルとなり得ると期待される。

### Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center.

#### Establishment and analysis of human ES cell lines.

Embryonic stem (ES) cell lines are pluripotent stem cell lines which can be propagated indefinitely in culture retaining their differentiation potency into every cell types of tissues in the body. Since establishment of human ES cell lines were reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells are expected. In Japan, there have been many demands for use of human ES cells on basic and pre-clinical researches. We started to establish human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established 5 human ES cell lines. We have distributed these cell lines to over 50 researches.

#### Generation of Cardiomyocytes from human ES cells.

Human embryonic stem cells (hESCs) are potential sources of cardiomyocytes for future heart therapy. It has been considered effective to generate functional cells from hESCs by reproducing the key events that regulate embryogenesis. Cardiomyocytes arise from cells that migrate to mid-to-anterior region of the primitive streak (PS) during embryogenesis. We previously showed that canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway signaling develop nascent PS populations from hESCs and that synergistic activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and inhibition of BMP signaling induce formation of anterior PS cells. We demonstrated that the induced anterior PS cells differentiated into functional cardiomyocytes using suspension culturing. All aggregates generated from the anterior PS cells developed into contracting cells demonstrating their cardiac potential. In contrast, the posterior PS cells induced by only  $\beta$ -catenin activation showed poor cardiac potential. These results show that the commitment to a cardiac lineage *in vitro* occurs through similar molecular signaling pathways in cardiac development *in vivo*. Hence, this system will provide a valuable culture model for studying early cardiac developmental event in hESCs.

## 【業績目録】

## ◆ 誌上発表 ◆

## 1) 原著論文

- Sakurai K, Shimoji M, Tahimic CG, Aiba K, Kawase E, Hasegawa K, Amagai Y, Suemori H, Nakatsuji N. Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 38 : e96. 2010
- Ishii T, Yasuchika K, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Alpha-fetoprotein producing cells act as cancer progenitor cells in human cholangiocarcinoma. *Cancer Lett.* 294 : 25-34. 2010
- International Stem Cell Initiative Consortium, Akopian V, Andrews PW, Beil S, Benvenisty N, Brehm J, Christie M, Ford A, Fox V, Gokhale PJ, Healy L, Holm F, Hovatta O, Knowles BB, Ludwig TE, McKay RD, Miyazaki T, Nakatsuji N, Oh SK, Pera MF, Rossant J, Stacey GN, Suemori H. Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 46 : 247-58. 2010
- Adachi K, Suemori H, Yasuda SY, Nakatsuji N, Kawase E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells.* 15 : 455-70. 2010
- Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 7 (2): 225-39. 2010
- Kaori Yamauchi, Tomoyuki Sumi, Itsunari Minami, Tomomi G. Otsuji, Eihachiro Kawase, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori. Cardiomyocytes develop from anterior primitive streak cells induced by  $\beta$ -catenin activation and the blockage of BMP signaling in hESCs *Genes to Cells.* 2010 15 : 1216-1227. 2010
- Ishii T, Yasuchika K, Fukumitsu K, Kawamoto T, Kawamura-Saitoh M, Amagai Y, Ikai I, Uemoto S, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N. In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers. *Cell Tissue Res.* 339 : 505-12. 2010
- Nishigaki T, Teramura Y, Suemori H, Iwata H. Cryopreservation of primate embryonic stem cells with chemically-defined solution without Me2SO. *Cryobiology.* 60 : 159-64. 2010

## 2) 総説

- 高田 圭, 末盛博文: 再生医療の最前線 2010 「再生医療に適した ES 細胞培養システム」 実験医学増刊 28, 204-208

## ◆ 学会等の講演 ◆

## 1) 学会・研究会発表

- Cardiomyocytes develop from anterior primitive streak cells induced by  $\beta$ -catenin activation and the blockage of BMP signaling in hESCs Kaori Yamauchi, Tomoyuki Sumi, Itsunari Minami, Tomomi G Otsuji, Eihachiro Kawase, Norio Nakatsuji, and Hirofumi Suemori 9th ISSCR Meeting (6/16-19 San Francisco)
- Gene Targeting In Human Pluripotent Stem Cells With Adeno-Associated Virus Vectors. Ko Mitani, Kaoru Mitsui, Keiichiro Suzuki, Emi Aizawa, Eihachiro Kawase, Hirofumi Suemori, and Norio Nakatsuji 16 回日本遺伝子



治療学会, 2010(7/1-3 宇都宮)

クロマチンの活性化はヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化を促進する 尾辻智美, 黒瀬裕子, 末盛博文, 中辻憲夫, 多田政子 第 33 回日本分子生物学会年会(12/7-10 神戸)

High content analysis(HCA)によるヒト ES 細胞の未分化維持因子の探索 熊谷英明, 末盛博文, 上杉志成, 中辻憲夫, 川瀬栄八郎 第 33 回日本分子生物学会年会(12/7-10 神戸)

ヒト ES 細胞からの原条形成過程におけるクロマチン修飾因子の発現解析 末盛博文 第 33 回日本分子生物学会年会 ワークショップ(12/7-10 神戸)

ヒト ES 細胞から見た多能性幹細胞の特性 末盛博文 第 9 回日本再生医療学会総会 シンポジウム「ES/iPS 細胞の特性・未分化性維持」(3/18-19 広島)

## 2) 講演・シンポジウム

6th Chiba Neuroresearch Meeting 特別講演 7/24 「ヒト ES/iPS 細胞の特性から見たその医療応用での問題点」  
末盛博文

公開シンポジウム：再生医療と細胞の足場：培養の立場，材料の立場 2/15 「多能性幹細胞の培養とその利用」  
末盛博文

## 幹細胞分化制御研究領域 Laboratory of Stem Cell Differentiation

分野主任 准教授 山下 潤

Assoc. Prof. Jun K. Yamashita

### 【研究概要】

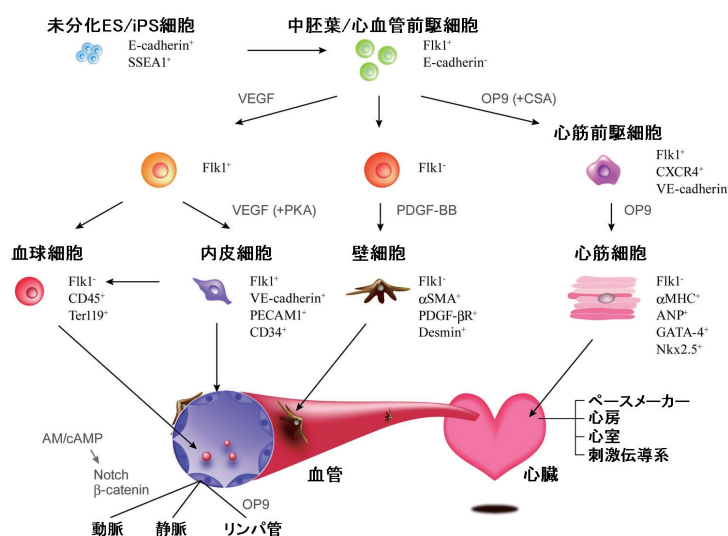
幹細胞分化制御研究領域では、ES 細胞(胚性幹細胞: embryonic stem cells)及び iPS 細胞(人工多能性幹細胞: induced pluripotent stem cells)を用いて、心血管系の細胞分化・再生に関する研究を行っている。

ES 細胞は、全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。この全能性(pluripotency)を in vitro において引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みが様々な臓器、細胞をターゲットに行われている。我々は、ES 細胞を用いて中胚葉由来組織である血管および心臓の分化研究を行ってきた。

血管は、内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の2種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に関連しあい血管を形作る。VEGF の受容体の一つである Flk1 は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。我々は、ES 細胞を用いて in vitro において中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)を選択的に分化誘導し、最終的に血管としての高次構造を in vitro および in vivo において構築すること、いわば血管の発生過程を再現することに成功した(Yamashita, *Nature*, 2000.)。この in vitro 分化系では、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が血管としての高次構造を形成する。また、中胚葉由来の細胞の一つである心筋細胞も同様に Flk1 陽性細胞から分化誘導することと共に新しい心筋前駆細胞の同定に成功している(Yamashita, *FASEB J*, 2005)。また最近では、動静脈リンパ管内皮細胞分化や心筋ペースメーカー細胞などにさらに多様な心血管細胞の分化誘導を行っている(Yamashita, *Trends Cardiovasc Med*, 2007; Yanagi, *Stem Cells*, 2007 他)(図)。最近我々は、免疫抑制剤のサイクロスポリン A が Flk1 陽性中胚葉細胞に特異的に作用し、心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化を促進する、という全く新しい作用

を見出した(Yan, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009)。また、血管内皮細胞分化を培養下において構造的に再現することにより、Protein kinase A が血管前駆細胞の VEGF への感受性を変化させて内皮細胞分化を促進していること(Yamamizu, *Blood*, 2009)、及び Notch と  $\beta$ -catenin が直接相互作用することにより動脈内皮への運命決定を行っていることを新たに示した(Yamamizu, *J Cell Biol*, 2010)。

さらに、最近本研究所山中伸弥教授によって樹立された人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を



用いて同様の実験システムを構築し、新たな心血管再生研究を開始している。ES細胞研究において蓄積したノウハウを用いていち早くマウス iPS 細胞を用いた心血管系細胞の分化誘導に成功した(Narazaki, **Circulation**, 2008)。またサイクロスポリン A の作用を応用し、ヒト iPS 細胞からの機能心筋細胞の誘導を効率化することにも成功した(Fujiwara, **PLoS One**, in press)。

このように我々の ES 細胞を用いた in vitro 分化系は、心血管および血球という循環器系の細胞群を系統的に分化誘導することができ、心血管の発分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる。従って、この分化系を用いることにより心臓血管の発分化のメカニズムを細胞レベル、分子レベルで検討し、ノックアウトマウスの形質解析に依存していた分化の分子機構の解析を in vitro で行うという新しいアプローチが可能になったと考えられた。

現在、この ES 細胞 in vitro 分化系を用いて、以下のようなプロジェクトを遂行及び予定している。

1. ES 細胞/iPS 細胞 in vitro 分化系を用いた心血管細胞分化多様化の分子機構の解析
  - 1) DNA チップを用いた網羅的心血管分化関連遺伝子の同定
  - 2) RNA 干渉を用いた in vitro 遺伝子機能解析系の構築(Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006)
  - 3) 動静脈・リンパ管内皮特異的分化誘導と内皮細胞多様化機構の解析(Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007; Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010)
  - 4) cAMP 及び PKA による血管前駆細胞の分化能調節機構(Yamamizu, **Blood**, 2009)
  - 5) 血管内皮分化及び血管形成におけるオピオイドの意義(星薬科大学との共同研究)
  - 6) 物理的刺激的血管内皮分化多様化における意義(Yamamoto, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2005)(東京大学との共同研究)
  - 7) ES/iPS 細胞分化過程におけるエピジェネティクス解析
2. 誘導血管細胞の血管再生への応用
  - 1) 移植ドナー細胞の最適な分化段階の決定(Yurugi-Kobayashi, **Blood**, 2003)。
  - 2) 人工生体材料を用いたハイブリッド人工血管(Huang, **J Artif Organ**, 2005)。
3. ES 細胞/iPS 細胞からの心筋細胞の分化誘導と再生治療応用
  - 1) 2 次元培養による新しい ES 細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発と新しい心筋前駆細胞の同定(Yamashita, **FASEB J**, 2005)。
  - 2) 心筋細胞 in vitro 分化系を用いた心筋分化・多様化の分子機構の解析
  - 3) ES 細胞由来心筋細胞自動能形成機構の解析(Yanagi, **Stem Cells**, 2007)
  - 4) サイクロスポリン A を用いた新しい高効率心筋前駆細胞・心筋細胞分化誘導法(Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009)(京都大学心臓血管外科との共同研究)
  - 5) 新しい心臓再生治療への応用。i)心筋前駆細胞移植。ii)ES/iPS 細胞由来心血管細胞を用いた心組織シート移植(東京女子医大・京都大学心臓血管外科との共同研究)
  - 6) サル ES 細胞からの血管分化誘導
 

サル ES 細胞からの血管分化誘導に成功(Sone, **Circulation**, 2003)(京都大学臨床病態医科学との共同研究)
  - 7) ヒト ES 細胞からの血管分化誘導

京都大学臨床病態医科学申請の輸入ヒト ES 細胞を用いた血管分化研究に参画(Sone, **Arterioscler Thromb**

**Vasc Biol**, 2007 ; Yamahara, **PLoS One**, 2008).

8) ヒト ES 細胞からの心筋細胞分化誘導

ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」(研究代表者・山下 潤, 平成 17 年 3 月 10 日文部科学大臣承認)

ヒト ES 細胞を用いた心血管分化研究を行っている。

9) マウス iPS 細胞を用いた心血管分化系の構築 (Narazaki, **Circulation**, 2008 ; **Best Paper Award** in Basic Science category, *Circulation* 2008)

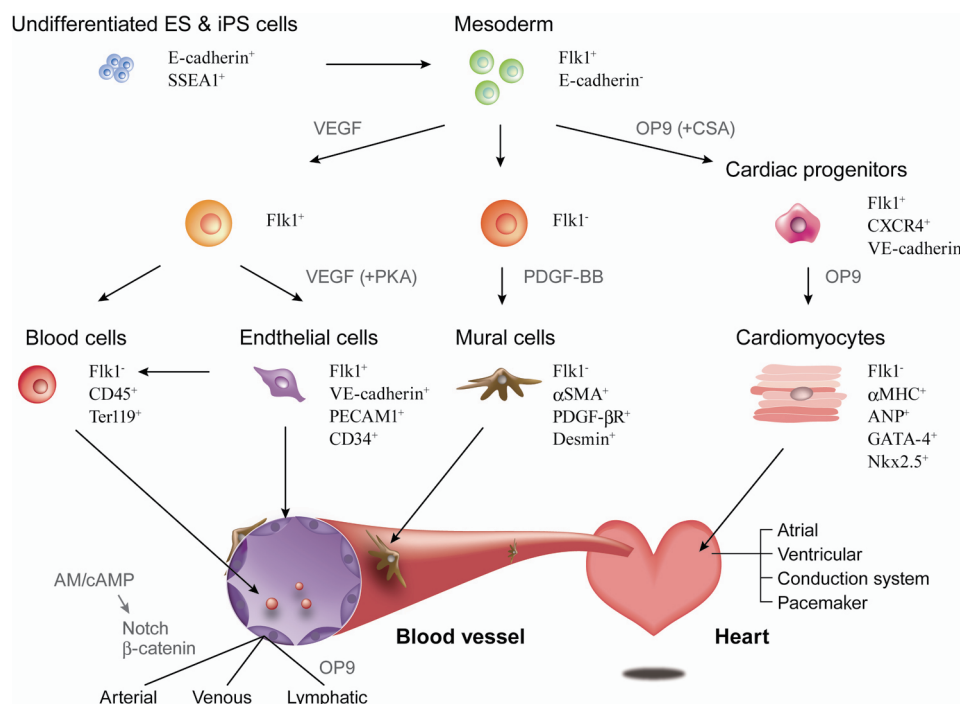
10) ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発. サイクロスポリン A 法の応用 (Fujiwara, **PLoS One**, in press). (臨床病態医科学との共同研究)

11) iPS 細胞分化システムのケミカルバイオロジー及び創薬応用 (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008) (早稲田大学他との共同研究)

12) 心筋細胞分化・増殖を促進する新しい化合物の探索・同定

**Main theme of our research :** Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular development and the application to cardiovascular regeneration using *in vitro* differentiation system of embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells.

Previously, we established a novel *in vitro* vascular differentiation system of ES cells (Yamashita, **Nature**, 2000). Using ES cell-derived Flk1 (VEGF receptor-2)-positive mesodermal cells as starting material, we can induce all of the vascular cellular compartments, that is, endothelial cells, mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) and blood cells. Vessel-like structures of endothelial cell tube with mural cell attachment and blood cell



**Fig. 1 : Cardiovascular development in ES and iPS cell *in vitro* differentiation**

inside are formed from Flk1+ cell aggregates in 3-D culture. Thus, this *in vitro* system should reproduce the early process of vascular development. And we also demonstrated that the transplanted vascular cells induced by this system could contribute to developing vasculature *in vivo*. Moreover, we have succeeded in inducing cardiomyocytes from Flk1+ cells, and identifying a novel cardiac progenitor cells (Yamashita, **FASEB J**, 2005). Recently, we succeeded in inducing arterial, venous, and lymphatic endothelial cells (Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007 etc). All of cardiovascular cellular components, thus, could be induced in our *in vitro* differentiation system. (Fig. 1). Recently, we found that an immunosuppressant, cyclosporin-A, possesses a novel effect to potently induce cardiomyocytes and cardiac progenitors from Flk1+ mesoderm cells (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006). Using our constructive induction system for vascular cells, we demonstrated that protein kinase A (PKA) enhances vascular progenitor potential to endothelial competent through dual upregulation of VEGF receptors, Flk1 and neuropilin1, in Flk1+ cells (Yamamizu, **Blood**, 2009). Moreover, we also demonstrated that Notch and  $\beta$ -catenin directly interact in Flk1+ cells and determine arterial endothelial cell fate (Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010).

Recently, we have started new research with the use of novel adult tissue derived pluripotent stem cells, induced pluripotent stem (iPS) cells, and succeeded in systematic cardiovascular cell differentiation of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008). We recently succeeded in efficiently inducing functional cardiomyocytes from human iPS cells using cyclosporin-A method (Fujiwara, **PLoS One**, in press).

In this system, we can manipulate the fate of cell differentiation, observe the behavior of differentiating cells, purify and obtain cells at various differentiation stages. This system provides us possibilities to dissect the mechanisms of cardiovascular development from new aspects, and offers novel potentials for cardiovascular regeneration.

#### Research Projects :

##### 1. Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular cell differentiation and specification using ES cell *in vitro* differentiation system.

- 1) Comprehensive molecular cloning of genes for endothelial cell differentiation by global gene expression profile with DNA chip
- 2) Novel *in vitro* functional assay system using vector-based siRNA expression (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006).
- 3) Specific induction of various endothelial cells types (i.e., arterial, venous, and lymphatic) and investigation of the mechanisms for endothelial specification (Yurugi-Kobayashi, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007; Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010).
- 4) PKA in the regulation of vascular progenitor potential (Yamamizu, **Blood**, 2009)
- 5) Significance of opioids in endothelium differentiation and vascular formation (collaboration with Hoshi University)
- 6) Significance of rheological force on endothelial differentiation and diversification (Yamamoto, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2005)
- 7) Global analysis of epigenetics in ES/iPS cell differentiation

## 2. Application of induced vascular cells to vascular regeneration

- 1) Evaluation of appropriate differentiation stage of donor cells for cell transplantation. (Yurugi-Kobayashi, **Blood**, 2003).
- 2) Development of novel hybrid vessels with ES cells and artificial scaffolds (Huang, **J Artif Organ**, 2005).

## 3. Cardiomyocyte induction from ES/iPS cells and application to regeneration

- 1) Establishment of a novel cardiomyocyte induction system in 2-dimensional culture (Yamashita, **FASEB J**, 2005).
- 2) Dissection of cellular and molecular mechanisms of cardiomyocyte differentiation
- 3) Ion channels to reconstitute automaticity of ES cell-derived cardiomyocytes (Yanagi, **Stem Cells**, 2007)
- 4) Specific and efficient expansion of cardiac progenitor cells and cardiomyocytes by cyclosporine-A (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009) (collaboration with Department of Cardiac Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine)
- 5) Application to cardiac regeneration
  - i) Cardiac progenitor therapy.
  - ii) Cardiac tissue sheet transplantation with defined cardiovascular cell population (collaboration with Tokyo Women's Medical University ; Department of Cardiac Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine)
- 6) Vascular cell differentiation from monkey ES cells (Sone, **Circulation**, 2003) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine).
- 7) Vascular cell differentiation from human ES cells (Sone, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2007 ; Yamahara, **PLoS One**, 2008) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences)
- 8) Cardiomyocyte differentiation using human ES cells  
Our human ES cell research project "Research for differentiation mechanisms of cardiovascular cell differentiation using human ES cells" has been approved by the Science Ministry of Japan (2005.3.10).
- 9) Establishment of cardiovascular cell differentiation system of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008 ; **Best Paper Award** in Basic Science category, *Circulation* 2008).
- 10) Cardiovascular cell differentiation and regeneration from human iPS cells. Application of cyclosporin-A method (Fujiwara, **PLoS One**, in press) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine)
- 11) Application of iPS cell differentiation system to chemical biology and drug screening (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008) (Collaboration with Waseda University)
- 12) Screening and identification of small molecules for cardiomyocyte differentiation and proliferation

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

(\* corresponding author)

Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Matsuda H, Kuwahara K, Harada M, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK\*. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A. **PLoS One**, in press

Yamamizu K, Yamashita JK\*. Roles of cAMP signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular development. **Circ J**, in press (Review)

Yamashita JK. ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration. **Exp Cell Res**, 316: 2555-2559, 2010 (Review)

Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, Yamashita JK\*. Convergence of Notch and  $\beta$ -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. **J Cell Biol**, 189: 325-338, 2010

Suzuki H, Shibata R, Kito T, Ishii M, Li P, Yoshikai T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Yamashita JK, Murohara T, Isobe K. Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells. **BMC Cell Biol**, 11: 72, 2010

Matsuda M, Yamashita JK, Tsukita S, Furuse M. abLIM3 is a novel component of adherens junctions with actin-binding activity. **Eur J Cell Biol**, 89: 807-816, 2010

#### 2) 和文総説

山水康平, 山下 潤. 「血管発生のメカニズム：内皮細胞の分化と動静脈形成」細胞工学「血管新生を制御する」29: 1075-1081, 2010

山下 潤. 「iPS細胞の発見が心血管再生医学研究に与えるインパクト」Cardiac Practice 特集「心血管系の再生医学」21: 17-22, 2010

山下 潤. 「血管内皮細胞の発生・分化－血管多様性研究のプロローグ」実験医学増刊「血管研究と血管治療」28: 28-35, 2010. 羊土社

山下 潤. 「iPS細胞の展望」Cardiovascular Frontier 別冊「特集再生医療」1: 111-117, 2010

山下 潤. 「心不全に対する iPS 細胞の臨床応用」医学の歩み「心不全－研究と臨床の最前線－」232: 559-605, 2010. 医歯薬出版

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

○山水康平, 山下 潤. Novel roles of cAMP signaling in endothelial cell differentiation and diversification from vascular progenitors. 第7回心血管幹細胞研究会. 2010. 1. 16. 東京

- Uosaki H, Yamashita JK. Expanding embryonic stem cell-derived cardiomyocytes by small molecules. Keystone symposia (Cardiovascular Development and Repair) (poster). 2010. 3. 3. Keystone, USA.
- Uosaki H, Yamashita JK. Small Molecules Regulating Differentiation and Proliferation of Embryonic Stem Cell-derived Cardiomyocytes. 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2010. 3. 7. Kyoto
- 魚崎英毅, 山下 潤. 低分子化合物を用いた ES 細胞由来心筋細胞の分化・増殖制御. 第 9 回日本再生医療学会総会. 2010. 3. 18. 広島
- 山水康平, 川崎京子, 片山志織, 渡部徹郎, 山下 潤. PKA は血管前駆細胞において VEGF 感受性を亢進し, 内皮細胞分化を促進する. 第 9 回日本再生医療学会総会. 2010. 3. 18. 広島
- 山水康平, 川崎京子, 片山志織, 渡部徹郎, 山下 潤. Adrenomedullin/cAMP/PKA pathway enhances vascular progenitor potential through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. Presentation of Young Investigator Award. 第 14 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 2010. 3. 31. 奈良
- Uosaki H, Yamashita JK. Chemical biological approach to enhance proliferation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. International Society for Stem cell Research 8th Annual meeting (poster). 2010. 6. 18. San Francisco, USA.
- Yamamizu K, Furuta S, Kuzumaki N, Natsuaki M, Katayama S, Furuya M, Yajima M, Imai S, Nagase H, Suzuki T, Narita M, Yamashita JK. Kappa opioid receptor regulates endothelial cell differentiation and vascular formation via VEGF receptors expression. International Society for Stem cell Research the 8th Annual Meeting (poster), 2010. 6. 18. San Francisco, USA
- Yamamizu K, Furuta S, Kuzumaki N, Katayama S, Suzuki T, Narita M, Yamashita JK. Kappa opioid system regulates vascular development via VEGF receptors expression. The 16th International Vascular Biology Meeting. 2010. 6. 22. Los Angeles, USA
- Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Yamamizu K, Furuta S, Imai S, Okano H, Yamashita JK, Suzuki T, Narita M. Opioid system regulates neural and endothelial cell differentiation from ES cells. International Narcotics Research Conference (INRC) 2010 Meeting (poster). 2010. 7.12. Malmö, Sweden
- 山水康平, 山下 潤. アドレノメデュリン/cAMP シグナルの血管内皮細胞分化及び血管多様化機構における新しい役割の解明. Presentation of Young Investigator Award. The 8th Metabolic Syndrome Conference. 2010. 7. 17. 京都
- 福島弘之, 魚崎英毅, 山下 潤. ES 細胞を用いた心筋分化を促進する化合物の探索. 第 31 回日本炎症・再生医学会(ポスター). 2010. 8. 5. 東京
- Uosaki H, Fujiwara M, Yamashita JK. Small molecules inducing robust proliferation of embryonic stem cell or induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. American Heart Association scientific session (poster). 2010. 11. 17. Chicago, USA
- 山水康平, 古田貞由, 片山志織, 成田道子, 葛巻直子, 今井哲司, 長瀬 博, 鈴木 勉, 成田 年, 山下 潤. 血管内皮細胞分化および血管走行制御におけるオピオイドの役割. Presentation of Young Investigator Award. 第 18 回日本血管生物医学会学術集会. 2010. 12. 3. 大阪
- 山水康平, 古田貞由, 片山志織, 成田道子, 葛巻直子, 今井哲司, 長瀬 博, 鈴木 勉, 成田 年, 山下 潤. 発生過程の血管内皮細胞分化および血管走行におけるオピオイドの役割. 第 33 回日本分子生物学会年会.



2010.12.10. 神戸

○山水康平, 古田貞由, 片山志織, 成田道子, 葛巻直子, 今井哲司, 長瀬 博, 鈴木 勉, 成田 年, 山下 潤.  
血管形成におけるオピオイドの新しい役割. 再生医科学研究所学術講演会 2010(ポスター). 2010. 12. 13.  
京都

## 2) 講演・シンポジウム

山下 潤. 再生医療の最前線 -ES細胞・iPS細胞を用いた心臓・血管の再生-. 日本化粧品技術者会大阪支部  
創立60周年記念行事(特別講演). 2010.1.27. 大阪

山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 神戸生活習慣病研究会. 2010.2.6. 神戸

山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 東京女子医科大学 IREIIMS 講演会. 2010. 2. 22.  
東京

山下 潤. ES細胞・iPS細胞を用いた心血管分化再生研究. 福岡心臓血管研究会(特別講演). 2010.3.1. 福岡

山下 潤. ES細胞・iPS細胞を用いた心血管分化再生へのアプローチ. 第3回「情報と細胞機能」研究会. 2010.  
3.4. 札幌

Yamashita JK. iPS cells for cardiovascular research and regeneration. 第74回日本循環器学会フォーカスセッション  
「iPS細胞の臨床応用とその課題」. 2010.3.6. 京都

山下 潤. 「ES細胞・iPS細胞を用いた心血管再生」第9回日本再生医療学会シンポジウム「心血管再生」2010. 3.  
18. 広島

Yamashita JK. Novel roles of cAMP pathway in endothelial cell differentiation and specification. 14<sup>th</sup> International  
Congress of Endocrinology symposium “angiogenesis”(invited). 2010.3.27. Kyoto, Japan

Yamashita JK. Research for mechanisms of cardiovascular cell differentiation and regeneration, and its clinical ap-  
plication. 第14回日本心血管内分泌代謝学会高峰譲吉研究奨励賞(受賞講演). 2010.3.31. 奈良

山下 潤. 「ES細胞・iPS細胞を用いた血管分化多様化機構の解析-血管におけるcAMPシグナルの新しい意  
義-」第33回日本血栓止血学会学術総会日本血管生物医学会ジョイントシンポジウム. 2010.4.23. 鹿児島

Yamashita JK. Induced pluripotent stem cells? Symposium; The race for the implantable cardiomyocyte: who is  
winning? XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto(invited). 2010.5.  
14. Kyoto, Japan

山下 潤. ES細胞・iPS細胞を用いた心血管分化再生研究-構成的アプローチによるメカニズム解析から臨床応  
用まで-東京大学医科学研究所セミナー. 2010.5.20. 東京

○魚崎英毅, 福島弘之, 山下 潤. ハイコンテンツスクリーニングシステムとES細胞を用いた新規心筋分化・増  
殖化合物の探索. 第11回モレキュラーデバーステクニカルセミナー. 2010.6.2 東京, 6.3. 大阪

○山水康平. オピオイドによる血管新生阻害作用. 第32回日本疼痛学会シンポジウム「オピオイド研究の新潮流」  
2010.7.2. 京都

Yamashita JK. Systematic cardiovascular cell differentiation from iPS cells. Annual Symposium of the American  
Heart Association, Basic Cardiovascular Science(invited). 2010.7.22. Palm Springs, USA

○魚崎英毅, 藤原正隆, 山下 潤. 低分子化合物を用いたES/iPS細胞由来心筋細胞の増殖制御. 第31回日本炎  
症・再生医学会ワークショップ「心・血管再生」2010.8.5. 東京

○山水康平, 山下 潤. 血管内皮細胞分化及び血管多様化機構におけるcAMPシグナルの新しい役割. 第31回日

本炎症・再生医学会ワークショップ「心・血管再生」2010.8.5. 東京

山下 潤. ES細胞及びiPS細胞を用いた心血管分化再生研究－基礎研究から臨床応用に至る領域横断的アプローチ－. 旭川脈管クラスター研究会. 2010.8.20. 旭川

山下 潤. ES-iPS細胞を用いた心血管再生の試み. 日本心血管インターベンション治療学会シンポジウム「再生医療でここまでできる」2010.8.22. 仙台

山下 潤. iPS細胞研究で未来を探る－新しい心臓血管再生治療の可能性－. JST イノベーションサテライト高知研究成果報告会(特別講演). 2010.9.9. 高知

山下 潤. ES細胞・iPS細胞を用いた心血管分化再生研究－構成的アプローチによるメカニズム解析から臨床応用まで－東京大学先端科学技術研究センターセミナー. 2010.9.14. 東京

山下 潤. iPS細胞の心筋再生への応用. 日本心不全学会シンポジウム「心筋細胞再生の現状と展望」(オーガナイザー). 2010.10.8. 東京

山下 潤. ES-iPS細胞を用いた心筋再生細胞治療及び創薬研究. iPS細胞産学合同研究会. 2010.11.25. 京都

Yamashita JK. Dual roles of cAMP pathway in endothelial cell differentiation and specification. The 8th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology(invited). 2010.12.3. Osaka, Japan

## 附属幹細胞加工研究領域 Laboratory of Stem Cell Engineering

分野主任 准教授 多田 高

Assoc. Prof. Takashi Tada

### 【研究概要】

#### 背景

受精から始まる個体発生は、たった一個の細胞の細胞分裂による数十兆個への増殖と共に、巧妙に制御された細胞分化によってもたらされる。この過程で、受精卵は、体を形つくる全ての種類の細胞に分化可能な多能性が失われ、限られた役割を果たすべく特殊化した細胞へと分化そして老化してゆく。一般に、分化は後戻りのできないプロセスとの概念が固定されていた。我々は、多能性幹細胞(pluripotent stem cell)の一種である胚性幹(ES)細胞と体細胞を細胞融合すると、体細胞核ゲノムのエピジェネティクスが書き換えられ未分化細胞様に再プログラム化されることを世界に先駆けて発見した(Tada et al.(2001)Curr. Biol. )。この結果は、分化細胞を直接培養条件下で多能性幹細胞に再プログラム化可能であること、またES細胞には体細胞の再プログラム化に必要な十分な因子があることを示していた。現在では、ES細胞から同定された因子(Oct4, Sox2, Klf4 & c-Myc)の強制発現により体細胞が多能性幹細胞(人工多能性幹(iPS; induced pluripotent stem)細胞)に再プログラム化されることが明らかになっている(Takahashi & Yamanaka(2006)Cell)。多能性幹細胞の未分化性維持に Oct4, Sox2, Nanog が中心的な役割を果たす転写因子として注目されている。

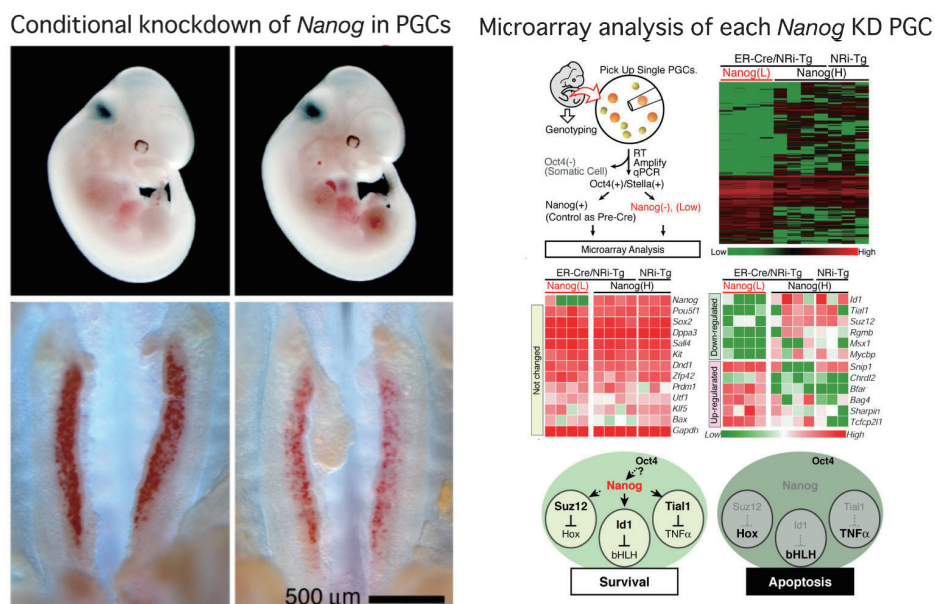


図 1. 生殖細胞での *Nanog* ノックダウンによる生殖細胞の減少と分子ネットワークの崩壊

**目的)**

- 1) 体細胞が多能性幹細胞に再プログラム化されるメカニズム
- 2) 再プログラム化に関わる因子の働き
- 3) 再プログラム化の医学応用技術の開発

**重要性)**

再プログラム化による個人体細胞からの多能性幹細胞の作製成功は、拒絶反応を伴わない移植分化細胞の医療応用の扉を開き、再生医療の現実性を高める大きな一歩である。医療応用に向けて、解決しなければならない問題に焦点を絞り、一步一步クリアーすることで基礎研究の社会への貢献が実現できると信じている。

再プログラム化における転写因子の働きは、その重要性を再認識させるのに充分である。再プログラム化メカニズムは、生命を次世代につなぐ仕組みを解き明かすための鍵と考えている。

Pluripotency of mouse iPS cells generated with Oct4, Klf4 and low Sox2

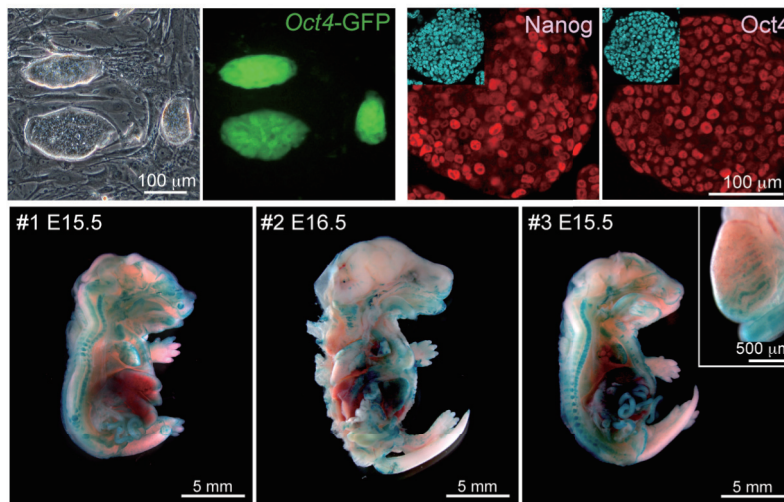


図 2. 低発現レベルの Sox2 を用いて誘導された iPS 細胞の多分化能

**Background)**

Our body is built by an incredible variety of cell and tissue types, which develop from a single fertilized egg through embryogenesis. Determination of the cell fate is epigenetically regulated through activation or repression of specific genes. Nuclear reprogramming is a phenomenon that a specialized somatic cell acquires pluripotential competence, which is defined by multi-lineage differentiation, due to reset of epigenetic memory of the somatic cell. We found that embryonic stem (ES) cells, which have the robust capability of self-renewal with pluripotency under culture conditions, retain the nuclear reprogramming activity as shown by cell fusion with a somatic cell (Tada et al. (2001) Curr.Biol.). These findings have indicated the reality of direct reprogramming of somatic cell under a culture condition with factors isolated from ES cells. Tremendously, it has been discovered that defined factors Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc highly expressed in ES cells are sufficient for triggering nuclear reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem (iPS) cells (Takahashi and Yamanaka (2006) Cell). It has been shown that Oct4, Sox2 and Nanog cooperatively function as key transcription regulators in the repression of somatic cell genes and the activation of stem cell genes in pluripotent stem cells.

Reprogrammed somatic genome through cell fusion with ES cells function in cell differentiation similar to the ES genome. Comparative analyses of epigenetic modifications of the somatic genome before and after cell fusion with ES cells demonstrated that the nuclear reprogramming is induced at least through two steps; a) erasure of the somatic cell memory accompanied with global chromatin de-condensation and b) acquirement of the pluripotent stem cell memory. However, the pathway from somatic cell to pluripotent stem cell is largely in the black box.

#### Aims)

- 1) Understanding of molecular mechanisms involved in nuclear reprogramming of somatic cells
- 2) Understanding of molecular function of stem cell factors in maintaining pluripotency and self-renewal
- 3) Development of nuclear reprogramming technologies toward clinical applications

#### Importance)

The reality of personal iPS cells from individual somatic cells through nuclear reprogramming rises the great hopes on regenerative medicine in near future. Toward realizing the regenerative medicine, further study will be required to overcome several ethical and practical obstacles.

Understanding of the molecular mechanisms of nuclear reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells will shed light on the central dogma, the succession of life.

### 【業績目録】

#### ◆ 誌上発表 ◆

##### 1) 原著論文

- Yamaguchi,S., Hirano,K., Nagata,S. and Tada,T. : Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. *Stem Cell Research*, in press
- Shineha,R., Kawakami,M., Kawakami,K., Nagata,M., Tada,T. and Kato,K. : Familiarity and prudence of the Japanese public with research into induced pluripotent stem cells, and their desire for its proper regulation. *Stem Cell Review*, **6**, 1-7 (2010)

##### 2) 著 書

- Kunio, H. and Tada,T. : Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. In “Nuclear reprogramming and stem cells” ed. by Ainscough,J., Yamanaka, S. and Tada, T. (Springer, Germany), in press
- Toyoda,M., Nagata,S., Makino,H., Akutsu,H., Tada,T. and Umezawa,A. : Generation of induced pluripotent stem cell from human amnion cells. In “Lineage-specific differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells methods and protocols” ed. by Ye, K. and Jin, S. (Humana Press, USA), in press.
-

## ◆ 学会等の発表 ◆

## 1) 学会・研究会発表

- Yamaguchi, S., Hirano, K. and Tada, T.: Effects of Sox2 expression level on direct reprogramming efficiency by alternative cell fate : 「BMB2010(第 33 回日本分子生物学会&第 83 回日本生化学会合同大会)」(2010.12.7-10, 神戸)
- Nagata, S., Hirano, K., Nakagawa, M. and Tada, T.: Generation of ground state human induced pluripotent stem cells with kinase inhibitors : 「BMB2010(第 33 回日本分子生物学会&第 83 回日本生化学会合同大会)」(2010.12.7-10, 神戸)
- Kunio, H. and Tada, T.: Balance of chromosomal gene dosage in pluripotent stem cells : 「BMB2010(第 33 回日本分子生物学会&第 83 回日本生化学会合同大会)」(2010.12.7-10, 神戸)
- Yamaguchi, S., Hirano, K., Nagata, S. and Tada, T.: Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate : 「International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells”」(2010.11.22-24, Fukuoka, JP)
- 山口新平, 平野邦生, 多田 高: 体細胞の iPS 細胞化の運命を左右するリプログラミング因子 Sox2 : 「第 82 回日本遺伝学会」(2010.9.20-22, 札幌)
- Hirano, K. and Tada, T.: Balance of chromosomal gene dosage in pluripotent stem cells : 「第 5 回研究所ネットワーク国際シンポジウム」(2010.6.24-25, 金沢)
- Yamaguchi, S., Hirano, K. and Tada, T.: Effects of Sox2 expression level on direct reprogramming efficiency by alternative somatic cell fate : 「43<sup>rd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists」(2010.6.21-23, Kyoto, JP)

## 2) 講演・シンポジウム

- 多田 高: 空想が現実になった核リプログラミング: 細胞融合から iPS 細胞へ: 「第 26 回京都賞記念ワークショップ・先端技術部門」(2010.11.12, 京都) (招待講演)
- 多田 高: ヒト体細胞の人工多能性幹(iPS)細胞化リプログラミングの効率化: 第 82 回日本遺伝学会シンポジウム「多様な生命現象におけるエピゲノム制御」(2010.9.20-22, 札幌) (招待講演)
- Tada, T.: Reprogramming efficiency and reprogramming in ground state of human somatic cells to iPSCs : 「Biology Seminar in York University」(2010.7.7, York, UK) (Invited)
- 多田 高: Nuclear Reprogramming of Somatic Cells-ES hybrid cells and iPS cells - : 「第 5 回研究所ネットワーク国際シンポジウム」(2010.6.24-25, 金沢) (招待講演)
- Nagata, S., Yamaguchi, S., Hirano, K. and Tada, T.: Reprogramming-susceptible somatic cells and reprogramming-optimized Sox2 expression : 「Symposium; “Nuclear Reprogramming: From germline to cloned animals” in 43<sup>rd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists」(2010.6.21-23, Kyoto, JP) (Invited)
- 多田 高: 融合細胞と iPS 細胞のリプログラミング: 日本細胞生物学会総会シンポジウム「遺伝現象におけるエピジェネティクス制御とリプログラミング」(2010.5.19, 大阪) (招待講演)
- 多田 高: ヒト iPS 細胞と尿膜細胞の可能性: 再生医療学会総会シンポジウム「ES/iPS 細胞の特性・未分化性維持」(2010.3.19, 広島) (招待講演)

## 細胞プロセッシング研究領域 Laboratory of Cell Processing

客員教授 高橋 恒夫

*Visiting Prof. Tsuneo A Takahashi*

客員准教授 楠田(古江) 美保

*Visiting Assoc. Prof. Miho Furue Kusuda*

特任講師 川瀬 栄八郎

*Lect. Eihachiro Kawase*

### 【研究概要】

細胞プロセッシング研究領域は、ヒト ES 細胞の臨床応用を目指しその基盤技術の研究開発を行うべく、設置された部門である。ES 棟地下に細胞処理施設(CPC : Cell Processing Center)を設置し、その管理を行うとともに、臨床応用可能な医薬品 GMP に準拠したヒト ES 細胞リソースの供給を目指し、その基盤技術の研究開発を行っている。CPC は空調管理、清浄度管理、及び作業管理を含む、医薬品 GMP ハードに準拠した施設としている。また CPC には、細胞調製室、閉鎖系として独立して細胞調製、培養が可能な Cell-processing Isolator システム、細胞保存室がある。

2010 年度は、新たに特別教育研究「新たな臨床応用レベルのヒト ES 細胞株樹立のプロジェクト研究」を中心に、霊長類幹細胞研究領域により樹立されたヒト ES 細胞株を、在来の培養手法を用いて培養試験を行っている。順次、臨床レベルで使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる取扱基準規格を構築、外部認証を受けると共に、臨床応用に使用可能なレベルのヒト ES 細胞株の樹立と、将来のヒト ES 細胞バンク構築の可能性の探索を行う。

また、臨床応用に必要となる要件として、動物由来成分を用いない完全合成培地、基質による培養の検討を行っている。これら試験の評価に必要な基準は、国際的に通用するレベルを目指している。この為我々は、ISCBI(International Stem Cell Banking Initiative)による ES 細胞バンキングの国際基準策定会議に参画し、既に研究レベルでのヒト ES 細胞のバンキングに関する品質基準が発行されている。現在、臨床レベルでのヒト ES 細胞バンキングの品質基準の策定に参画している。

この他、ヒト ES 細胞株のより適切な品質管理体系の確立の為に、その凍結保存過程に着目し、温度制御ステージつき顕微鏡を用いたヒト ES 細胞コロニーの凍結解凍過程の解析、及び DSC(示差走査熱量計)を用いた熱力学的解析を通じた、細胞、コロニーレベルでの凍結解凍現象の理論化、凍結解凍条件の最適化の検討を試みている。

The Laboratory of Cell Processing was established to develop basic technologies to produce and supply human embryonic stem cells (hES cells) with clinical grade. The cell processing center (CPC), located at underground level of the ES building in the Institute, was built to establish hES cells for clinical use satisfying the standards of Pharmaceutical Good Manufacturing Practices (GMP) and the research necessary to achieve that. The CPC meets the

hardware standard of GMP such as management of work, air conditioning, clean level of air, etc. The CPC is composed of several rooms, one for cell processing, one for the Cell-Processing Isolator in which cells can be processed and cultured in a complete closed system, cell-storage, computer controlled observation room, cell storage, supply room etc.

Following the approval of the Government (MEXT) that the CPC can be used as a facility to establish hES cells, we have started research on the establishment, culture and banking of hES in this facility.

For the clinical application of hES cells, there are several issues remain to be solved, such as developing an effective complete defined culture medium and substrate without animal components. To verify these factors we should develop a standard that meets the international level. For this we have joined the Working Group for International Standards for ES cells and their banking organized by the ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative). Recently the ISCBI established “Consensus Guidance for Banking and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes” as a first stage, and now working on that for Clinical Purposes.

One important aspects of our research is to develop an effective protocol for cryopreservation of hES cells that should significantly increase the recoveries of the cells that is quite low at present. In this study we utilize a cryo-microscope equipped with a temperature-controlling stage to observe the cells under freezing and thawing, and a differential scanning calorimeter to measure heat transfer in the cell and suspension medium during the process. First, we have refined our methods with single h

ES cells and then colonies, and the techniques will be refined and validated on hES cells. We expect this strategy will allow us to find an optimal cryopreservation protocol for hES cells that will contribute to make these cells suitable for clinical use.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

- Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, mt2010241 [pii] 10.1038/mt.2010.241
- Miho Kusuda Furue, Daiki Tateyama, Masaki Kinehara, Jie Na, Tetsuji Okamoto, J. Denry Sato Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 46 : 573-576, (2010)

-----



◆ 学会等の発表 ◆

**学会・研究会発表**

HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導 稲村 充, 川端健二, 高山和雄, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江-楠田美保, 水口裕之 第 17 回肝細胞研究会 6 月 18-19 日 秋田

SOX17 遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導 高山和雄, 稲村充, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江-楠田美保, 川端健二, 水口裕之 第 17 回肝細胞研究会 6 月 18-19 日 秋田

## 再プログラム化研究領域

## Laboratory of Reprogramming Research

客員教授 鳥居 隆三

Visiting Prof. Ryuzo Torii

## サル体細胞核移植クローン胚の作製

## Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkey

## 【研究概要】

過去3年間にわたり実施してきた体細胞核移植によるテラーメードES細胞作製の試みは、継代出来るES細胞株の樹立には至らなかった。本年度はさらに核移植後の再構築胚の発生改善を目的としてトリコスタチンA (TSA)の添加を試みた。また、再構築胚の初期における染色体分配が正常に行われているか否かを確認する方法として、ライブセルイメージング法を試みた。その結果、TSAは今回用いた濃度条件では発生改善に効果がみられなかった。また再構築胚の初期の2細胞期胚のライブセルイメージングにおいては染色体分配異常が多く見られた。一方、正常な染色体分配が見られた胚においては胚盤胞期胚まで発生し、内部細胞塊(inner cell mass: ICM)を取り出しES細胞樹立を試みることが出来た。しかし、継代3代目において接着できず樹立には至らなかった。

以上の成績から、カニクイザルにおいては体細胞核移植法によるテラーメードES細胞樹立法は胚の減失の問題に加え胚盤胞期胚作製の効率が極めて悪く、残念ながらES細胞樹立は極めて困難であるとの結論に至った。他方、カニクイザルからのiPS細胞は比較的容易に樹立できたことから、臨床応用研究にはむしろiPS細胞が有用であると考えられる。

## 1. トリコスタチンA添加によるカニクイザルの体細胞核移植胚の発生改善の検討

未受精卵子の核を取り除いた後にドナーとなる体細胞(胎子線維芽細胞)を注入する核移植法によって再構築胚を作製した後、培養液中にマウスやウシの核移植後の胚の発生改善に用いられているヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチンA(trichostatin A: TSA)を5nM添加した。その結果、Table1に示したように、核移植後の再構築胚への発生に今回用いた濃度のTSA添加は何ら効果がみられず、発生改善効果は得られなかった。

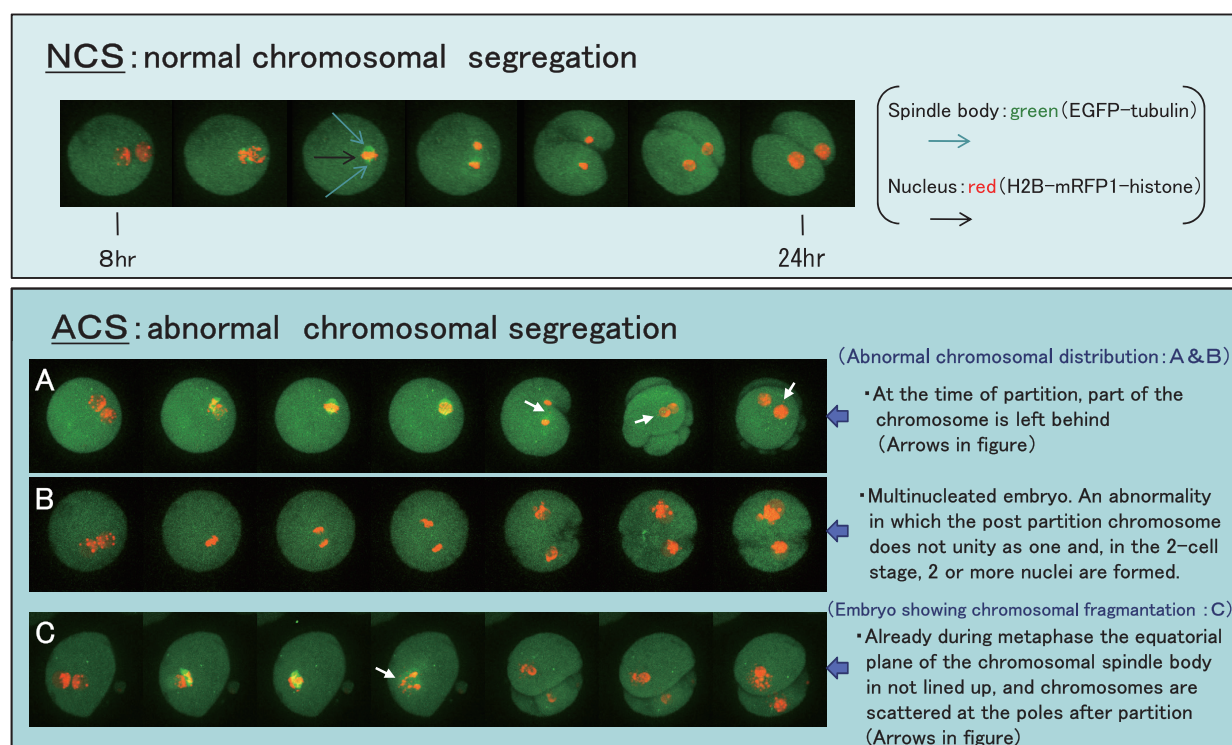
Table 1 Effect of Trichostatin A (TSA) in development of nuclear transferred embryo in cynomolgus monkey

No. of oocyte	No. of enucleation /injection	No. of activation (IM+DMAP)	No. of treatment with TSA		No. (%) of 2-cell	No. (%) of 4-cell	No. (%) of 8-cell	No. (%) of morula	No. (%) of blastocyst
28	22/22	22	0nM	12	6 (50)	5 (42)	3 (25)	0 (0)	0 (0)
			5nM	11	6 (55)	6 (55)	6 (55)	0 (0)	0 (0)

## 2. 蛍光ライブセルイメージングによる体細胞核移植胚の染色体分配の観察

体細胞核移植による再構築胚は、受精胚の発生過程と同様に核の脱凝集や再凝集といった染色体構造レベルにおいて大きな変化が見られ、さらに染色体の分配においてクロマチンや核の構造レベルの変化が見られる。今回は再構築胚において、この染色体分配が正常に行われているか否か確認するために初期胚のライブセルイメージング法を理研(RIKEN)山縣先生のご協力を得て、方法の開発とそれを用いて実際の再構築胚で確認を試みた。

ライブセルイメージング法を確立するために、まず顕微授精(intra cytoplasmic sperm injection)胚における染色体分配を確認した。その結果、染色体分配が正常に行われた NCS(normal chromosome segregation)授精胚では、その後の胚移植により産子を得ることが出来たが、異常が見られる ACS(Abnormal chromosome segregation)授



(Joint research with Dr. Kazuo Yamagata and Dr. Teruhiko Wakayama)

Fig. 1 Development of embryos by intra cytoplasmic sperm injection after mRNA injection by live-cell imaging

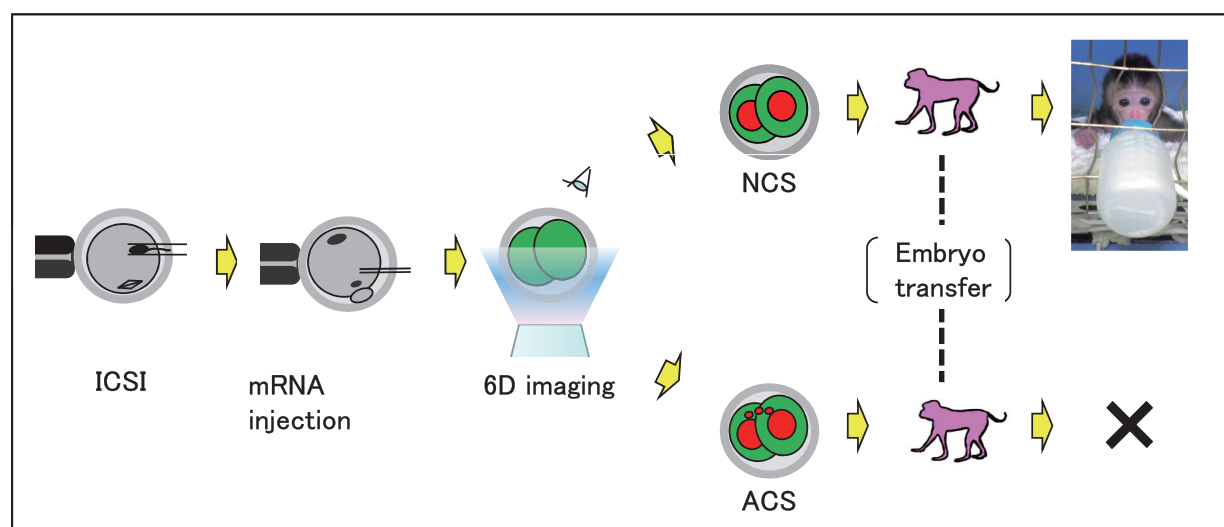


Fig. 2 Birth after embryo transfer of NCS or ACS embryo detected by live-cell imaging

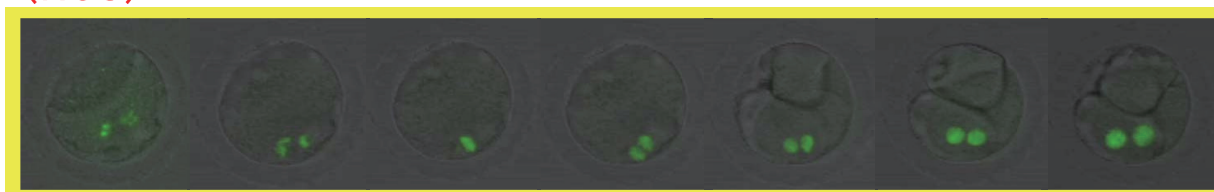
精胚は、途中発生が停止あるいは胚盤胞期胚に進んでも胚移植後、着床、妊娠は成立しないことを確認した(Fig. 1 & 2).

Table 2 Development of nuclear transferred embryos after mRNA injection

Donor cell	No. of oocyte	No. of enucleation/injection	No. of activation (IM+DMAP)	No. of mRNA injection		No. (%) of 2-cell	No. of NCS or ACS		No. (%) of 4-cell	No. (%) of 8-cell	No. (%) of morula	No. (%) of blastocyst	ES established
adult fibroblast (Passage : 0 to 1st)	106	89/80	78	-	7	4 (57)	-		4	4	2	0	-
				injection	63	18(29)	NCS	7	5	0	0	0	-
							ACS	11	6	3	0	0	-
fetus fibroblast (Passage :5th)	20	16/13	13	-	7	2(29)	-		2	2	0	0	-
				injection	4	1(25)	NCS	1	1	1	1	1	± (CE0955F)
							ACS	0	0	0	0	0	-

NCS:normal chromosome segregation  
 ACS:abnormal chromosome segregation  
 IM:ionomycin  
 DMAP:6-dimethylaminopurine

(NCS)



(ACS)

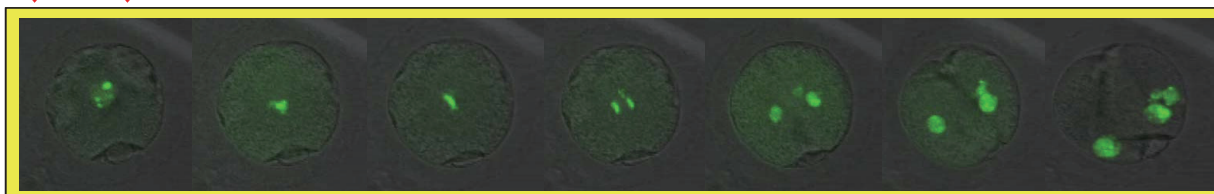


Fig. 3 Development of nuclear transferred embryos after mRNA injection by live-cell imaging

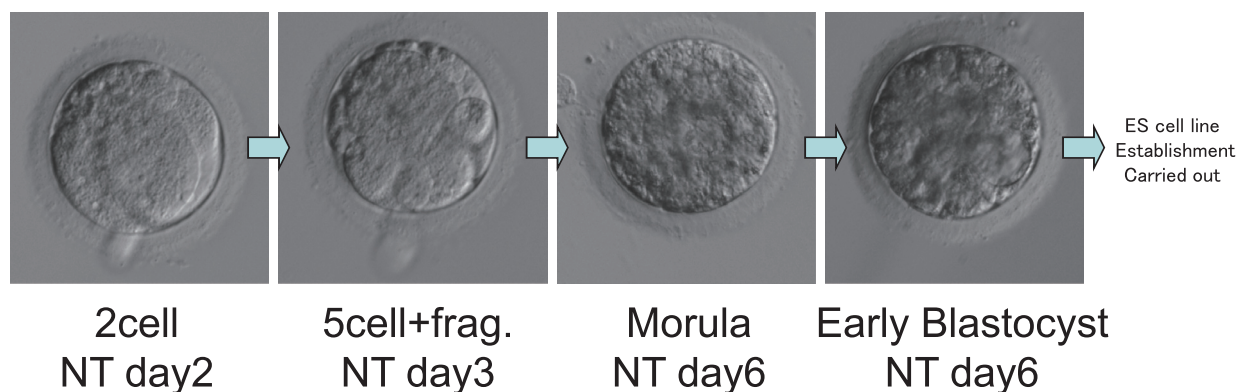


Fig. 4 Establishment of ES cells from nuclear transferred NCS embryos (CE0955F) in cynomolgus monkey

次に、体細胞核移植胚において同様にライブセルイメージングを試みた結果、Table 2に示したように、成熟個体の皮膚細胞から得た線維芽細胞では8細胞期胚で停止したが、胎子線維芽細胞では1例ではあったが、NCSにおいて順調に発生し胚盤胞期胚から内部細胞塊(inner cell mass)を分離することが出来、ES細胞を継代するまでに至った。しかし、3代目に至る継代において接着が不十分でES細胞樹立には至らなかった(Fig. 3 & 4)。

今回はライブセルイメージングを行うための方法の確立と、顕微授精胚におけるNCSとACSに産子獲得という大きな差が生じることを確認したことから、このライブセルイメージングは再構築胚の初期のスクリーニング法として有用であることが考えられ、今後さらに例数を増やして確認を進めたい。

#### **Research abstract :**

We did not succeed in obtaining ES cell lines that are capable of passage in our attempt to create tailor-made ES cells in the somatic cell nuclear transfer that we have been doing for the past three years. This year we attempted to improve the development of reconstructed embryos subsequent to nuclear transfer by adding Trichostatin A (TSA). Additionally, we attempted to confirm whether or not chromosomal segregation was being carried out normally during the initial stages of embryonic reconstruction using live-cell imaging. The results were that the TSA concentration conditions used this time were not effective in improving development. Additionally, there was much abnormal chromosomal segregation observed during the live-cell imaging of the 2-cell embryo in the initial stages of embryonic reconstruction. On the other hand, embryos in which normal chromosomal segregation was observed developed to the blastocyst stage, and it was possible to remove inner cell mass (ICM) and attempt to establish ES cell lines. However, we were unable to reach the 3<sup>rd</sup> generation of passage and unable to achieve establishment.

From the above results, for the tailor-made ES cell establishment method using the somatic cell nuclear transfer method in the cynomolgus monkey, in addition to problem of embryo loss, the efficiency for creating blastocyst-stage embryos was extremely poor, and we reached the determination that regrettably ES cell establishment was extremely difficult. On the other hand, it was relatively easy to establish cynomolgus monkey iPS cells, and it goes without saying that iPS cells are expected to be useful in clinical application research.

#### **1. Study on the improvement of embryonic generation by somatic cell nuclear transfer in the cynomolgus monkey with addition of Trichostatin A**

After the constructed embryos were created using the nuclear transfer method, in which donor cells (fetus fibroblast) are injected into denuded mature oocytes, 5nM of Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor used to improve the development of murine and bovine embryos after transfer, was added to the incubation medium. The results, as shown in Table 1, were that no effect was seen in terms of development of reconstructed embryos from nuclear transfer with the concentration of TSA that was used this time, and no effect in regard to improved development was obtained.

#### **2. Observation of chromosomal segregation in somatic cell nuclear transferred embryos using fluorescent live-cell imaging**

As for reconstructed somatic cell nuclear transferred embryos, large changes were seen at chromosomal con-

struction levels, such as disaggregation or recondensation of the nucleus in the same manner as occurs in the development process in fertilized embryos; furthermore, changes were seen at the chromatin or the nuclear construction level in chromosomal segregation. This time, in the embryonic construction, we obtained the cooperation of Dr. Yamagata (RIKEN CDB) for live-cell imaging in the initial embryonic stage in order to determine whether this chromosomal segregation was carried out normally or not, and we attempted to develop this method and use it in actual confirmation of embryonic reconstruction.

In order to establish the live-cell imaging method, we first confirmed chromosomal segregation in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryos. As the results of this, we found that offspring were obtainable from embryo transfers done after normal chromosomal segregation (NCS) was carried out in fertilized embryos, but we confirmed that in cases where abnormality was seen (abnormal chromosomal segregation, or ACS) the development of the fertilized embryo was arrested in midstream or, even if it did progress to the blastocyst stage, after embryo transfer it failed to implantation and pregnancy failed (Fig.1)

Subsequently, in the somatic cell nuclear transferred embryos the same manner of live-cell imaging was attempted, and, as the results show in Table 2, in the fibroblast obtained from the skin cells of mature individuals, development stopped at the 8-cell stage embryo, but, in 1 fetus fibroblast case, it was possible with NCS to develop smoothly and separate the ICM from the blastocyst, and we obtained passage of the ES cells. However, adhesion was insufficient when obtaining passage number 3, and we failed to establish the ES cells (Fig. 2).

This time, since we established the methodology necessary for carrying out live-cell imaging and confirmed the large gap in the acquisition of offspring which occurs with NCS and ACS in ICSI, we believe that this live-cell imaging will be useful for screening during the initial stages of embryonic reconstruction, and in the future we hope to increase our experience and further develop our confirmation ability.

## 【業績目録】

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 学会・研究会発表

岩谷千鶴, 山崎樹里, 土屋英明, 岡原純子, 鳥居隆三(2010) 成熟卵子採取のためのインフュージョンポンプによるカニクイザル卵巣刺激法, 日本 生殖再生医学会第5回学術集会, 東京(2/21/10)

山崎樹里, 山縣一夫, 岩谷千鶴, 土屋英明, 岡原純子, 若山照彦, 鳥居隆三(2010) カニクイザル顕微授精胚へのライブセルイメージング法の適用, 日本生殖再生医学会 第5回学術集会, 東京, (2/21/10)

# 附属ナノ再生医工学研究センター Research Center for Nano Medical Engineering

## ナノバイオプロセス研究領域 Department of Nano Bioprocess

分野主任 教授 楠見 明弘

*Prof. Akihiro Kusumi*

### 【研究概要】

#### 1. 生きている細胞中での1分子観察と操作法の開発

世界的には、in vitroでの1分子観察と操作ができる研究室は増えてきている。しかし、私達の研究室の特徴は、1分子観察と操作を生細胞中でおこなうことで、それによって、1分子細胞生物学が可能になった。具体的には生きている細胞中の1分子を、マイクロ秒レベルの時間分解能、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、それらの分子の活性化(反応)までも1分子毎に見る方法を開発してきた(これらは世界でも我々のみ)。これは、ナノサイエンス/ナノテクノロジーとの融合領域として、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物学という新しい学問分野の創造につながりつつある。

なお、以下の発見は、1分子法を使って初めて可能になったものであり、単なる生細胞中でのイメージングや多数分子の計測では不可能であったものばかりである。

#### 2. 細胞膜の基本的な構造と、働き方について

細胞膜は2次元の液体(連続体)と考えられてきた。しかし、私達は、(1)細胞膜はコンパートメント化されていること、(2)これは細胞膜に取り込まれた全ての分子に対して働くこと、(3)その機構は、基本的にはアクチン膜骨格によるもので、膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質が拡散障壁として働くこと、などを示した。これは、シンガー-ニコルソンモデルに重要な変更を迫るものであり、膜の構造と働き方について、基本的なパラダイムシフトを起こした研究である。

さらに最近、電子線トモグラフィー法を用いて、細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化することに成功した。細胞膜試料として、細胞膜の内側表面を急速凍結ディープエッチ白金レプリカに写し取ったものを用いた。これによって、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めたところ、それが、膜分子の拡散によって得られたコンパートメントの大きさとピッタリと一致した(図1参照)。

受容体はシグナルを受けた後、会合して運動を停止するものが多いが(シグナルが来た位置を数十秒程度記憶する)、これは、会合体が膜骨格によるコンパートメントに閉じ込められるか、膜骨格に結合することによることがわかった。さらに、神経細胞の細胞膜には脂質をも通さない拡散障壁が生じるが、これも、アクチン膜骨格とここに結合する膜貫通型タンパク質が密に集合することによって出来ることを示した。

#### 3. シグナル伝達の基本的な仕組みについて

シグナル伝達は、多くの場合、シグナル分子のランダムな拡散運動と衝突によって担われると考えられてきた。



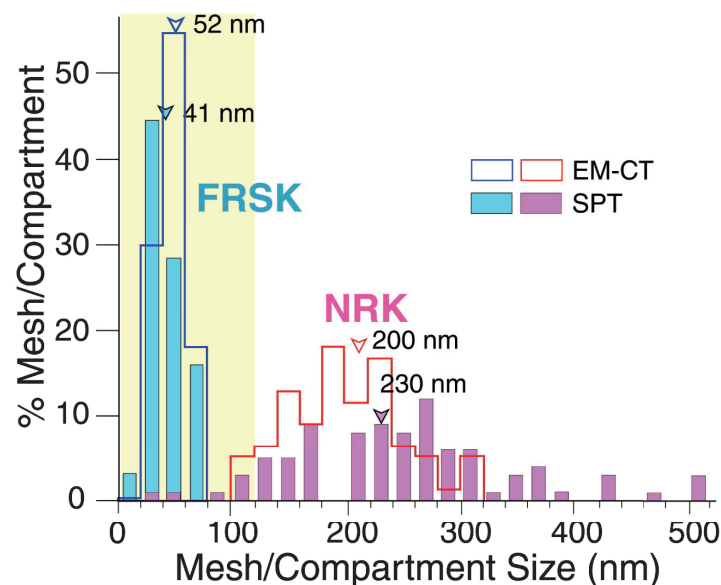


図 1

細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤がNRK細胞、青が、FRSK細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる2種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

近年の、多くの足場タンパク質の発見は、これとは全く逆に、上流と下流の分子は、足場タンパク質が関与する場合にはずっと結合しているものであり、シグナルが来たら、固体の電気回路のように、シグナルを伝えるものであると考えられるようになった。しかし、私達は、ある分子が活性化されると、それに結合する足場タンパク質、下流分子などが急速に集まって信号複合体を形成すること、それらの多くは安定ではなく1秒以下の寿命で分解(不活化)する、ことを見いだした(Ras-Rafの系、ラフトの関与する系)。すなわち、1回毎のシグナル伝達は量子化されており、多数分子の平均として観察される生化学やイメージングによるシグナル変化は、これらの量子的なパルス状のシグナルの和であり、それを担うのがこれらの短寿命シグナル複合体であることが示された。これは、シグナル系のシステムとしての働き方を理解するためには、極めて重要な知見で、きわめて動的なシグナル分子の組織化によるシステム動作の一端が見えてきたと言える。

### [Summary of Research]

#### Paradigm shift of the concept of the plasma membrane structure

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (Fujiwara et al., 2002; Murase et al., 2004; Kusumi et al., 2005; Morone et al., 2006). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous 2-dimensional fluid to the compartmentalized, structured system. This could be found because we have developed high time resolution (25 microseconds) single-molecule tracking techniques (Kusumi et



al., 2005). If more than one molecule is observed at the same time, the single hop event would be masked by averaging over all the molecules under observations. Without high-time resolutions, the residency time within a compartment for 1 ms to 1 s could not be detected.

### Single-molecule force microscope

An ultra-sensitive, single-molecule optical force scanning probe microscope was developed that uses a single membrane molecule as a probe. This microscope measures the interaction force between the membrane-molecule probe with the membrane skeleton mesh in live cells, and, by mapping the force, images of the membrane skeleton that interact with the membrane molecule were obtained (Ritchie et al., in preparation). A theoretical framework was developed to understand/predict the behavior of single membrane molecules being dragged by the optical trap (Ritchie et al. in preparation).

### Detection of transient interactions of two species of molecules in living cells

Two species of molecules were labelled in different colors, and a method to detect their colocalization at the level of single molecules was developed for the first time (Koyama et al., 2005).

### Single-molecules FRET imaging of H-Ras activation in living cells

The activation of H-Ras, a GTP-binding protein involved in the signaling pathways for cell proliferation and reorganization of the cytoskeleton, was visualized at the level of individual molecules using a technique called single-molecule fluorescence resonance energy transfer (single-molecule FRET ; Murakoshi et al., 2004 ; Kusumi and Murakoshi, 2005). Activation of H-Ras takes place only temporarily (<2 s), and is accompanied by transient immobilization, which is likely due to the transient formation of an activated-Ras signaling complex with scaffolding proteins.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文・総説

- A. Kusumi, Y. Shirai, I. Koyama-Honda, K. G. N. Suzuki, and T. K. Fujiwara : Hierarchical organization of the plasma membrane : investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy. FEBS Lett. 584 : 1814-23(2010)
- Kenji A K Tanaka, Kenichi G N Suzuki, Yuki M Shirai, Shusaku T Shibutani, Manami S H Miyahara, Hisae Tsuboi, Miyako Yahara, Akihiko Yoshimura, Satyajit Mayor, Takahiro K Fujiwara, and Akihiro Kusumi : Membrane molecules mobile even after chemical fixation. Nature Methods. 7 : 865-866(2010)
- Rinshi S. Kasai, Kenichi G. N. Suzuki, Eric R. Prossnitz, Ikuko Koyama-Honda, Chieko Nakada, Takahiro K. Fujiwara, and Akihiro Kusumi : Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. Journal of Cell Biology. (in press)

## 2) 和文総説

鈴木健一, 楠見明弘: 細胞膜が働くしくみ「膜機構」の解明－高分解能 1 分子追跡で見る細胞膜メゾスケールドメインの階層構造. 実験医学 5 月号. **28(8)**:1241-1250(2010)

笠井倫志: 細胞膜における GPCR の 1 分子観察法を用いた研究. 医学のあゆみ「最新・G 蛋白質共役型受容体研究」(2010)

楠見明弘: 細胞のメゾワールドを解く. 光学. **39(5)**:218(2010)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 国際学会・外国の学会での招待講演

#### 1A) 国外開催

A. Kusumi: Signal-molecule tracking approaches to membrane domains. HFSP Frontiers Meeting(2010.3.3-6 Strasbourg, France)

A. Kusumi: Signal transduction by lipid-anchored molecules as revealed by single-molecule tracking. 2010 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology(2010.4.24-28 Anaheim, U. S. A.)

A. Kusumi: Signal transduction by lipid-anchored molecules as revealed by single-molecule tracking. MRC Laboratory for Molecular Cell Biology (LMCB) Scientific Advisory Board(2010.6.16-17 London, U. K)

A. Kusumi: Two-Tiered Meso-Structures of the Plasma Membrane as Revealed by Single-Molecule Tracking. 2010 FASEB Summer Research Conferences: Molecular Biophysics of Cellular Membranes(2010.8.1-6 Saxtons River, U. S. A.)

A. Kusumi: Three-tiered functional meso-structures of the plasma membrane as revealed by world-fastest single-molecule tracking: prospects for NCBS-iCeMS collaboration, building an even faster imaging stations. NCBS-iCeMS Joint Symposium(2010.8.25 Bangalore, India)

#### 1B) 国内開催

T. Fujiwara: Hop diffusion of membrane lipids and proteins in the plasma membrane as directly observed by high-speed single fluorescent-molecule tracking. The 6th iCeMS International Symposium/The 13th International Membrane Research Forum(2010.01.27-29 Kyoto, Japan)

R. Kasai: First determination of the dimer dissociation constant of GPCR in the living cell membrane. The 6th iCeMS International Symposium/The 13th International Membrane Research Forum(2010.01.27-29 Kyoto, Japan)

K. G. N. Suzuki: Lipid-stabilized homo-dimers of GPI-anchored proteins based on ectodomain protein interactions. The 6th iCeMS International Symposium/The 13th International Membrane Research Forum(2010.01.27-29 Kyoto, Japan)

A. Kusumi: Raft-based signal transduction based on transient molecular interactions revealed by single-molecule imaging. Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University(2010.3.12-14 Nagoya, Japan)

A. Kusumi: A tale of two meso-scale membrane domains as told by single-molecule tracking. Traffic Symposium: Future Directions in Cellular Trafficking(2010.6.4 Kyoto, Japan)

A. Kusumi: Meso-scale membrane domains as studied by single-molecule tracking. The 7<sup>th</sup> iCeMS International

Symposium: Emerging Approaches and Applications in Developmental Biology: Taking the Next Step (2010.6.24 Kyoto, Japan)

K. G. N. Suzuki: Meso-scale raft domains: whether and how they exist and work in steady-state cells? The 8th iCeMS International Symposium: "Meso-Control of Functional Architecture" (2010.11.9-11 Kyoto, Japan)

K. G. N. Suzuki: Single-molecule imaging studies of meso-scale raft domains in steady-state cells. Association Of Pacific Rim Universities (APRU) Research Symposium "Interface Between Molecular Biology And Nano-Biology" (2010.11.24-26 Kyoto, Japan)

K. G. N. Suzuki: How does the meso-scale raft domain exist and transform to work? : a single-molecule imaging study. The 2nd NCBS-inStem/iCeMS Joint Symposium (2010.12.17 Kyoto, Japan)

## 2) 国内での招待講演

鈴木健一: 1分子追跡でみえてきた細胞膜ラフトが働くしくみ, 生理学研究所所長招聘セミナー (2010.1.19 愛知)

楠見明弘: 細胞膜シグナル変換のスイッチ機構: 1分子追跡による研究, 法政大学分子ウイルス学研究室主催セミナー (2010.3.2 東京)

楠見明弘: 細胞膜の準安定メゾスコピック動的複合体の機能: 1分子イメージングによる研究, 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成21年度第2回班会議・公開シンポジウム (2010.3.19-20 大阪)

楠見明弘: 細胞膜メゾドメインの動的構造・機能を1分子で見る, 日本物理学会第65回年次大会 (2010.3.20-23 岡山)

楠見明弘: 1分子追跡で見るラフトメゾ領域でのシグナル変換, 第19回酵母合同シンポジウム「イノベーションを推進する酵母研究」 (2010.6.24-25 東京)

楠見明弘: 液体の細胞膜を働かせるメゾ機構: 1分子追跡と操作による解明, 九州大学グローバルCOEプログラム「未来分子システム科学」第8回先端生命科学特論特別講義 (2010.7.13 福岡)

楠見明弘: 3つの細胞膜動的メゾ構造が担うシグナル変換: 1分子追跡・操作の楽しみ, 九州大学グローバルCOEプログラム「未来分子システム科学」第116回G-COEセミナー (2010.7.13 福岡)

楠見明弘: 細胞のメゾワールドを1分子追跡で調べる, 生命科学若い研究者の会 第50回生命科学夏の学校 (2010.9.3-5 神奈川)

楠見明弘: 1分子ナノバイオロジー, 京都大学医学研究科 神経科学ミニコース集中講義 (2010.9.16 京都)

楠見明弘: 1分子イメージング解析でシグナル変換機構を解明する, 京都大学医学研究科「生活習慣病・老化・代謝医学コース」 (2010.11.9 京都)

## シミュレーション医工学研究領域 Department of Medical Simulation Engineering

准教授 玄 丞休

Assoc. Prof. Suong-Hyu Hyon

### 【研究概要】

本研究室では、生体組織と力学的に調和する生体材料や人工臓器の開発など生体機能の再生を目的とした診断・治療の支援を行うために、コンピュータ科学や材料工学の手法を用いて、以下のような基礎的ならびに応用的研究を行っている。

#### 1. 生体組織の力学的適応変形に関するシミュレーション

生体組織の力学的特性の解明を基本として、特に骨のモデリングならびにリモデリング現象など生体組織の力学的合理性の適応変形過程などについて数値シミュレーションを行っている。その結果、等応力分布あるいは等歪エネルギー密度分布などの制約関数に従って、各種骨組織の形態が形成されていることが示唆され、この制約の下に、生体組織と力学的に調和する人工関節等のインプラントのデザインの創生を試みている。（新エネルギー・産業技術総合開発機構助成金）

#### 2. 人工歯根周囲における歯根膜の再生

現在の人工歯根は、天然歯根のように歯根膜を持たず、直接顎骨に固定させるので、咀嚼時の動的荷重が緩衝されず直接顎骨に伝わる。その結果、歯槽骨に過大な応力が発生して骨吸収が起こり、ゆるみが生じる危険性が高い。そこで、チタン製人工歯根をポリマーで被覆し、表面処理により細胞接着性タンパク質であるコラーゲンを固定化し、さらにその上に歯根膜細胞を培養し、歯根膜ならびにセメント質の再生を図っている。（文部科学省科学研究費補助金）

#### 3. MR Elastography (MRE) による in vivo 弾性率データの計測、解析および検証

磁気共鳴弾性率計測法(MRE)は、MRIをベースとする新たな測定技術であり、これによる体内組織・器官の非侵襲性弾性率計測の手法を確立し、医療研究支援用の生体組織データベースを構築する。また触感デバイスを用いた人工現実感(VR)によるVRモデルシステムを開発している。（医学研究科情報学専攻との共同研究）

#### 4. 人工関節軟骨・人工椎間板などの医療用ハイドロゲル

関節軟骨が持つ優れた力学的特性を具備した人工関節軟骨材を開発することにより、関節の病変部のみを置換し健全な軟骨下骨梁を残す新しい人工関節軟骨の開発を目指している。当研究室にて新しく開発した高強度・高弾性率ポリビニルアルコールハイドロゲルは人工関節軟骨・椎間板材料として有望である。（医学研究科整形外科科学講座との共同研究、厚生労働省科研費）

#### 5. 耐摩擦・摩耗特性に優れた人工関節用ポリエチレン

人工関節の摺動部に使用される超高分子量ポリエチレンの摩耗粉により発生する不良肉芽組織が骨吸収を惹起する異物反応が問題となっている。そこで、物理的な改良法により最終成形物に分子配向と結晶面配向を導入することにより、耐摩耗性の改良を試み、良好な結果が得られていた。本技術とライセンスは米国バイオメット社に移転され臨床応用された。

## 6. ポリフェノールによる細胞増殖制御と生体組織の長期間保存

緑茶ポリフェノール成分であるエピガロカテキンガレート(EGCG)が細胞・組織の保護作用を持つことを発見し、生体組織の保存に応用する研究を行っている。角膜に関しては、既存の角膜保存液は約1週間の保存期間であったが、EGCGを添加することにより2週間の保存期間でも上皮、内皮ともに形態、機能を維持することができる保存液を開発した(京都府立医科大学眼科教室共同研究)。

末梢神経を約4週間保存し、その後移植することで拒絶無く生着させる事が可能であることを見出した(京都大学医学部整形外科共同研究)。

脾臓は凍結解凍によりダメージを受けインスリン分泌能などが低下するため臨床用には凍結保存法は採用されていない。我々は凍結障害を防止し、形態・機能共に維持したまま保存することが可能であることを示した(京都大学医学部移植外科共同研究)。

EGCGで組織を処理することにより移植後の急性期拒絶を抑える可能性を見出した。マウスリンパ球の表面抗原の解析を行い、EGCGが免疫細胞の抗原認識を一部阻害することが原因であることを突きとめ、リンパ球移植実験で効果を確認した。この技術を用いることにより将来的に免疫抑制剤の投与量を減少させることが期待される。

EGCGで移植用血管を処理することで移植後の内膜肥厚を抑制し狭窄を予防できることを発見した。これにより心臓疾患治療のための冠動脈バイパス手術の成功率を高めることが可能である(京都大学医学部心臓血管外科共同研究)(日本科学技術振興機構プレベンチャー事業、文部科学省科学研究費基盤研究B)

## 7. 人体に優しい義歯床

現在、臨床で広く使用されている義歯床として、加熱重合タイプのポリメチルメタクリレート(PMMA)と、射出成型タイプのポリサルホン(PS)やポリカーボネート(PC)が知られている。加熱重合タイプのPMMAは、重合に伴う収縮率が高く、耐衝撃性等の力学的特性に劣る上、特に残留モノマーが多いため、使用時に残留モノマーの溶出によるアレルギー反応が惹起されることが指摘されており、生体に対する安全性の問題が残っている。

そのため、これに替わる材料としてPSやPCが射出成型用義歯床として使用されるようになって来た。ところがPSは耐衝撃性に劣り、またPCについても、残留モノマーであるビスフェノールが、近年環境ホルモンとしての毒性が大きく取り上げられている。さらにPMMA補修部材としての接着性が悪い為、人体にとって安全で、しかも耐衝撃性等の力学的特性に優れ、残留モノマーが少ない義歯床が切望されてきた。

本研究では、残留モノマーが極めて少なく、刺激や毒性のない人体に優しいのみならず、耐衝撃性や高曲強度で、耐久性に優れた射出成型タイプの義歯床を開発し、臨床の場に提供できた。(近畿経済産業局速攻型地域新生コンソーシアム研究開発事業)

## 8. 生分解性を有する2液反応型の新規医療用接着剤

生体接着剤の中で多くの分野で大量に使用されているのはフィブリン糊である。しかし、血液凝固作用を利用した血液製剤であるため、C型肝炎の感染症問題が非常に大きな社会問題となっている。現状は、各病院ともフィブ

リン糊の使用に際して、患者より C 型肝炎のリスクがあることを理解している旨の承諾書を取った上で使用されており、フィブリン糊に代わる安全性の高い医療用シーラントの出現が切望されている。また、フィブリン糊の接着力は低く創傷面から剥がれやすいこと、および生体内での分解が早すぎることも問題視されている。

現在までの研究で、分解速度が任意にコントロール可能であること、フィブリン糊より柔軟性が高いこと、毒性が極めて低いこと、フィブリン糊より接着力が高いこと、食品添加物を原料とするため安価で提供できることなどが分かった。更に、心臓血管外科領域での血管の止血、胸部疾患外科領域での肺の空気漏れ閉塞、および消化器外科領域での肝臓の止血など種々の用途での動物実験の良好な結果に基づいて、新規医療用接着剤として実用化でき臨床応用の可能性を見出した。（新エネルギー・産業技術総合開発機構 NEDO：イノベーション推進事業平成 20 年～22 年度）

## 9. DMSO・血清フリーの不凍ポリアミノ酸による iPS 細胞の凍結保存

培養細胞を利用した研究は生物学や医学分野において欠かせないものであり、各種細胞の維持、保管は主に液体窒素などを用いた低温保存により行われている。培養細胞だけでなく、受精卵や精子などの生殖細胞や血液細胞なども凍結保存されている。また、再生医療に有用な幹細胞も移植前には凍結保存されることが想定される。その際、細胞の機能や生存率をできるだけ維持するため、凍結に由来する様々な障害を防止する目的で凍害防御剤を添加する必要がある。凍害防御剤としてはジメチルスルホキシド(DMSO)やグリセリンなどが挙げられる。DMSO は細胞内に浸透し氷晶の形成を抑制することで凍結時の細胞へのダメージを軽減していると言われ、またグリセリンは細胞を脱水すると共に細胞内において水の結晶化を抑制していると言われる。しかし DMSO は毒性が高く解凍時に速やかに除去する必要がある。また細胞によっては分化に影響を及ぼすなどの問題点があるため、毒性が低く効果の高い凍害防御剤の開発が望まれている。当研究室では、世界で初めて異種たんぱく質の血清フリーで、しかも DMSO と同等以上の凍害防御機能のある高分子化合物を開発した。（文部科学省再生医療実現化プロジェクト：平成 20 年～24 年度、文部科学省科学研究費基盤研究 B：平成 22 年～24 年度）

### 1. Simulation of Biomechanical Adaptation Process of the Living Tissues.

Numerical simulations are carried out especially on the modeling and remodeling phenomena of the bones as the biomechanical adaptation. With constraint functions such as stress distribution or strain energy density distribution, it is indicated that the form of the bone has been modeled, and the design of artificial dental roots which dynamically harmonizes with the living tissue under this constraint has been tried. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

### 2. Regeneration of the periodontal Membrane around Dental Implant Roots.

The present artificial dental root is fixed directly in the alveolar bone without having periodontal ligament like natural tooth root, the stresses are directly transmitted without any damping effect. The excessive stresses in the alveolar bone may arise and cause the bone resorption by which the loosening of the implants occurs. Therefore, we have been attempting that the dental implant made of titanium is covered with a polymer, and the collagen which is the cell adhesive protein is fixed by some surface treatments, and in addition, the periodontal ligament cell is cultivated on the surface for regeneration of the periodontal membrane. (Supported by Ministry of Culture, Science and Education)

### **3. MR Elastography Measurement, Analysis and Verification.**

Magnetic resonance elastic modulus measurement method (MRE) of the elastic modulus is a new measuring technique based on the MRI, and it establishes the technique of the noninvasive elastic modulus measurement of the living tissue and organ in vivo. Database construction for the medical research support, and virtual reality (VR) system using the haptic device are investigated. (Joint Research with Information Division, Kyoto University)

### **4. New Artificial Articular Cartilage and Intervertebral Disk.**

Development of the artificial cartilage and intervertebral disk is necessary in order to recover support and mobility simultaneously in joints and spine which received the damage. We examined the possibility of the application of polyvinyl alcohol hydrogel which can control the mechanical strength by the change of water content and is excellent in the biocompatibility. It replaces only lesion part and leaves the sound subchondral bone. The high strength and high elastic modulus of the polyvinyl alcohol hydrogel newly developed in this department is promising as artificial articular cartilage and intervertebral disk material. (Supported by Japan Ministry of Health, Labour and Welfare)

### **5. Polyethylene for Artificial Joints with High Wear Resistance.**

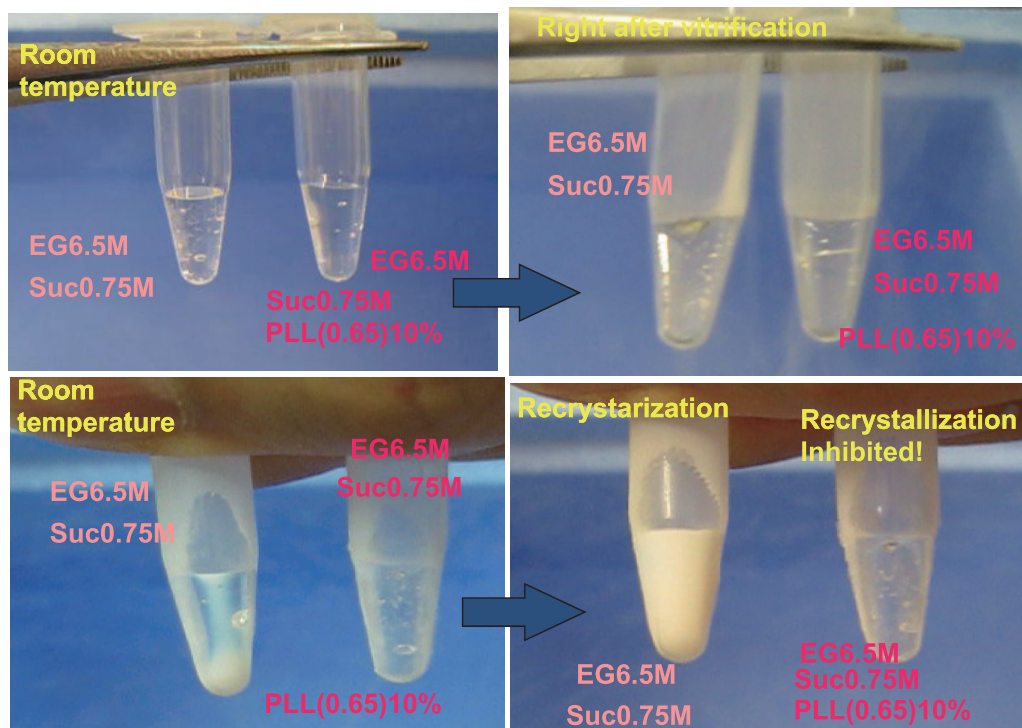
The wear particles of polyethylene are produced by the friction between the metal and UHMWPE when artificial joint used for the long term. It is known that the osteolysis occurs by foreign body granulation tissue which the wear particle induces. The development of new UHMWPE for artificial joint which controlled super structure by the crystallization under molecular orientation is being tried in order to improve abrasion resistance of UHMWPE.

### **6. Proliferation Control of Mammalian Cells and Tissue Preservation for Long Term.**

EGCG, a green tea polyphenol, not only improves preservation of non-frozen tissues such as cornea, nerves, and pancreatic but solves some potential problems pertaining to transplantation and cardiovascular medicine. EGCG with its immuno-suppressive and anti-proliferative effects prevents graft rejections in various tissues and neo-intimal hyperplasia in vein grafts, respectively. Therefore, the use of EGCG for preserving the living tissues and controlling their cellular responses will provide us a starting point to advance the future of regenerative medicine. (Supported by Japan science and technology)

### **7. The gentle denture base in human body**

Today, we are researching and developing novel thermoelastic denture base composed of polymethyl-metacrylate (PMMA) as a main component for injection molding. Denture base is generally employed polycarbonate (PC) as thermoelastic resin. However, PC is eluted in one's mouth, bis-phenol A of an environmental pollution, and furthermore, poor adhered to PMMA resin of repair adhesive. Heat-polymerized type PMMA mainly employed as denture base, is eluted in one's mouth a lot of monomer and oligomer, which come from residue product of polymerization, and is anxious to cause an allergy. We are researching and developing novel thermoelastic denture base which overcomes disadvantages of traditional denture resin. (Supported by Kinki area economy department of industry)

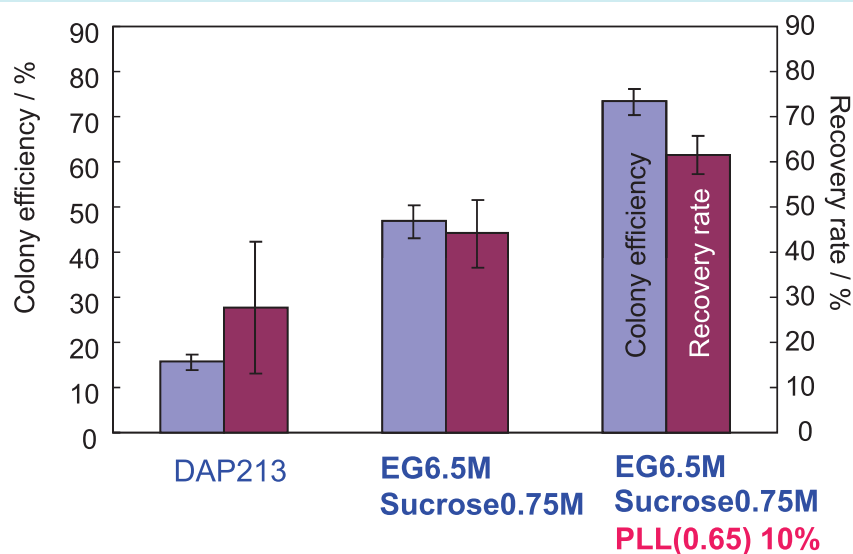


Novel vitrification solution does not recrystallize during thawing process.  
There are small damage to the cell with the recrystallization.

図 1：不凍ポリアミノ酸 PLL(0.65) でのガラス化後の昇温時の氷再結晶化抑制効果

### Human iPS cells recovery rate and colony number after vitrification

The colony was suspended for 30 seconds in 200mL vitrification liquid, and it spread in the liquid nitrogen. The thawing adds 37°C medium of 1mL.



Recovery rate= Cell number at 4 days after thawing /  
Cell number at 4 days without freezing

図 2：不凍ポリアミノ酸を用いたヒト iPS 細胞の解凍後コロニー形成率と回復率



## 8. Biodegradable Medical Adhesives

The closing, sealing, and bonding of wounds and defects in various types of tissue still remain problem areas in the field of medicine. To bond a soft tissue interface, numerous studies have been conducted to develop either synthetic or semi synthetic tissue adhesives. Cyanoacrylate, aldehyde-based, and fibrin glue have all been developed for clinical usage. However, some problems have led to limitations in their application, such as toxicity and virus infection.

We recently developed functional medical adhesive of dextran based reactive glue, consisting of aldehyded dextran and  $\epsilon$ -poly (L-lysine), two kinds of medical and food additives, as starting materials. Biocompatibility assay indicated that the functional medical adhesive showed excellent biocompatibility with in vitro and in vivo and most of the functional medical adhesive was histologically degraded within 4 weeks. The excellent performance was observed in comparison to the use of conventional fibrin glue. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

## 9. Antifreeze Polyamino Acid with the Cryoprotective Function

Cryoprotective agents (CPAs) such as dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol, and propylene glycol have been used for the cryopreservation of cells and tissues. DMSO is the most effective CPA but shows high cytotoxicity and can effect differentiation.  $\epsilon$ -poly-L-lysine (PLL) derivatives show higher cryopreservation efficiency than the conventional CPAs. Culture medium solutions with 7.5 w/w% of PLL whose amino groups of more than 50 mol% were converted to carboxyl groups by succinic anhydride showed higher post-thaw survival efficiency of L929 cells than those of current CPAs without the addition of any proteins. In addition, rat mesenchymal stem cells were cryopreserved more effectively than with DMSO and fully retained the potential for proliferation and differentiation. Furthermore, many kinds of cells could be cryopreserved with PLL having the appropriate ratio of COOH groups, regardless of the cell types, including adhesive and floating cells, human and mouse derived cells, primary cells and established cell lines. The properties might be associated with the antifreeze protein properties. These results indicate that these polymeric extracellular CPAs may replace current CPAs and the high viability after thawing and non-necessity of serum ensure that these CPAs may be used in various preservation fields. (Supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan)

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Matsumura, K., Bae, J.-Y., Hyon, S.-H. : Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. *Cell Transplant.* Vol. **19** 691-699 (2010)

Matsumura, K., Hayami, T., Hyon, S.-H., Tsutsumi, S. : Control of proliferation and differentiation of osteoblasts on apatite coated poly(vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage material. *J Biomed Mater Res.A* **92A** : 1225-1232 (2010)

Matsumura, K., Tsutsumi, S., Hyon, S.-H. : Regeneration of Periodontal Tissues around Dental Implants. *Journal of*

World Congress for Oral Implantology (in press)

- Nakai, R., Azuma, T., Kishimoto, T., Hirata, T., Takizawa, O., Hyon, S-H., Tsutsumi, S. : Development of a high-precision image-processing automatic measurement system for MRI visceral fat images acquired using a binomial RF-excitation pulse. *Magn Reson Imaging*. 2010 May ; **28**(4): 520-6.
- Bae, J-Y., Han, D-W., Matsumura, K., Wakitani, S., Nawata, M., Hyon, S-H. : Nonfrozen preservation of articular cartilage by epigallocatechin-3-gallate reversibly regulating cell cycle and NF- $\kappa$ B expression. *Tissue Engineering Part A* **16**(2)595-603(2010)
- Bae, J-Y., Han, D-W., Matsumura, K., Wakitani, S., Nawata, M., Hyon, S-H. : Biological and biomechanical evaluations of osteochondral allografts preserved in cold storage solution containing epigallocatechin gallate. *Cell Transplant*. Vol. **19** 681-689(2010)
- Nakamura, J., Nakajima, N., Matsumura, K., Hyon, S-H. : Water-soluble taxol conjugates with dextran and tartrates tumor cells by folic acid immobilization. *ANTICANCER RESEARCH* **30** 903-910(2010)
- Nakamura, J., Nakajima, N., Matsumura, K., Hyon, S-H. : In Vivo Cancer Targeting of Water-Soluble Taxol by Folic Acid Immobilization. *Nanomedicine & Nanotechnology*, (in press)
- Morishima, M., Marui, A., Yanagi, S., Nomura, T., Nakajima, N., Hyon, S-H., Ikeda, T., Sakata, R. : Sustained release of vancomycin from a new biodegradable glue to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* graft infection. *Interactive Cardiovascular And Thoracic Surgery* **11** 52-55(2010)
- Tanaka, S., Hayashi, T., Tateyama, H., Matsumura, K., Hyon, S-H., Hirayama, F. : Application of the bactericidal activity of  $\epsilon$ -poly-L-lysine to the storage of human platelet concentrates. *Transfusion* Vol. **50** 932-940(2010)
- Kobayashi, M., Hyon, S-H. : Development and evaluation of polyvinyl alcohol-hydrogels as an artificial articular cartilage for orthopedic implants. *Materials*, **3**, 2753-2771(2010)
- Kashiwa, K., Kotobuki, N., Tadokoro, M., Matsumura, K., Hyon, S-H., Yoshiya, S., Ohgushi, H. : Effects of epigallocatechin-gallate (EGCG) on osteogenic capability of human mesenchymal stem cells (MSCs) after suspension in phosphate buffered saline. *Tissue Eng A*. **16** : 91-100(2010)
- 田中基嗣, 八谷悠生, 石原 亘, 田中秀和, 北條正樹, 玄 丞, 近田英一, 金原 勲 : 静水圧押出成形 HAp/PLLA 複合材料の引張・圧縮特性に及ぼす加水分解の影響. *日本複合材料合同会議講演論文集*, 381-384(2010)
- Yanagi, S., Matsumura, k., Marui, A., Morishima, M., Hyon, S-H., Ikeda, T., Sakata, R. : Oral pretreatment with a green tea polyphenol for cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* (in press)
- Han, D-W., Jung, D-Y., Park, J-C., Cho, H-H., Hyon, S-H., Han, D- K. : Underlying mechanism for suppression of vascular smooth muscle cells by green tea polyphenol EGCG released from biodegradable polymers for stent application. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH A* Vol. **95A** 424-433(2010)
- Han, D-W., Lee, M-H., Kwon, B-J., Kim, H-L., Hyon, S-H., Park, J-C. : Selective Inhibitory Effect of Epigallocatechin-3-gallate on Migration of Vascular Smooth Muscle. *Cells Molecules* **2010**, 15(11), 8488-8500
- Han, D-W., Lee, M-H., Kim, H-H., Hyon, S-H., Park, J-C. : Dose-differential regulation of cell growth, cell cycle, and phosphorylated nuclear factor- $\kappa$ B in human dermal fibroblasts by epigallocatechin-3-gallate. *Acta Pharmacologica Sinica* (in press)
- Lee, M-H., Han, D-W., Hyon, S-H., Park, J-C. : Apoptosis of human fibrosarcoma HT-1080 cells by epigallocatechin-3-

O-gallate via induction of p53 and caspases as well as suppression of Bcl-2 and phosphorylated nuclear factor- $\kappa$ B”, Apoptosis, (in press)

Ino, T., Nakai, R., Azuma, T., Kimura, T., Fukuyama, H. : Differential activation of the striatum for decision making and outcomes in a monetary task with gain and loss. *Cortex*. **46**(1): 2-14(2010)

Ino, T., Nakai, R., Azuma, T., Kimura, T., Fukuyama, H. : Gender differences in brain activation during encoding and recognition of male and female faces. *Brain Imaging and Behavior*. **4**(1): 55-67(2010)

Nakayama, K., Kakinoki, R., Ikeguchi, R., Yamakawa, T., Ohta, S., Fujita, S., Noguchi, T., Duncan Scott FM, Hyon, S-H., Nakamura, T. : Storage and allogeneic transplantation of peripheral nerve using a green tea polyphenol solution in a canine model. *Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury* 2010, **5** : 1749-7221

近藤政芳, 小林正典, 松村和明, 玄 丞然 : 圧縮性 PVA-H を用いた人工半月板の動物実験. *臨床バイオメカニクス*, Vol.31 171-176(2010)

Takeda, T., Shimamoto, T., Marui, A., Saito, N., Uehara, K., Minakata, K., Miwa S., Nakajima, N., Ikeda, T., Hyon, S., Sakata, R. : Topical application of a biodegradable disc with amiodarone for atrial fibrillation. *Annals of Thoracic Surgery* (in press)

水野仁二, 玄 丞然, 松村和明, 乾 裕昭, 菊地瑛子, 野口香里, 丹治百合, 赤石一幸, 阿部 崇, 安齋 憲, 村山嘉延 : ART(生殖補助医療技術)のためのクライオナノホールコンテナと不凍ポリアミノ酸(カルボキシル化  $\epsilon$ -Poly-L-Lysine)を用いた低毒性, 完全無血清のガラス化保存システムの開発. *日本受精着床学会誌* (in press)

Vrana, N E., Matsumura, K., Hyon, S-H., Geever, LM., Kennedy, JE., Lyons, JG., Higginbotham, CL., Cahill, PA., McGuinness, GB. : Cell encapsulation and cryostorage in PVA/Gelatin Cryogels : incorporation of carboxylated  $\epsilon$ -Poly -L-Lysine as cryoprotectant. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (in press)

## 2) 著 書

玄 丞然, 中島直喜 : 生体接着剤. 「食品・化粧品・医療分野へのゲルの利用」(西成勝好, 梶原莞爾, 長崎幸夫, 金田 勇監修, シーエムシー出版, 東京)211-218(2010)

## 3) 総 説

Lee, J-H., Kim, H-Y., Jung, T-G., Han, I., Park, J-C., Park, K-D., Cho, J-B., Hyon, S-H., Han, D-K., Han, D-W. : Recent R&D trends of medical adhesives and anti-adhesion membranes. *Biomaterials Research* **14**(2) 66-77(2010)

松村和明, 玄 丞然 : iPS/ES 細胞の大規模保存システムの開発. *再生医療*. 9 : 3; 349-354. (2010) メディカルレビュー社

---

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

Hyon, S-H., Matsumura, K. : Novel vitrification of human induced pluripotent stem cells. TERMIS AP 2010 Meeting (2010. 9. 15-17 Sydney)

- 松村和明, 裴 庭胤, 玄 丞休: 新規ガラス化法によるヒト iPS 細胞の凍結保存. 第 9 回日本再生医療学会 (2010.3.18-19 広島)
- Matsumura, K, Hyon, S-H.: Novel low toxic cryoprotective agents as alternatives to DMSO. The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs (CRYO), (2010. 5. 27-30 Valencia)
- Matsumura, K., Hyon, S-H.: Successful cryopreservation of human mesenchymal stem cells and vitrification of human induced pluripotent stem cells using carboxylated poly-L-lysine. 47th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (CRYO-2010). (2010.7.17-20. Bristol, )
- Matsumura, K., Bae, J-Y., Hyon, S-H.: Successful vitrification of human iPS cells. 第 37 回日本低温医学会 (2010. 11.11-12 東京)
- 竹田知史, 新実彰男, 猪野正志, 中井隆介, 東 高志, 井上英樹, 山口将史, 松岡弘典, 陣内牧子, 大塚浩二郎, 小熊毅, 中治仁志, 田尻智子, 岩田敏之, 伊藤功朗, 松本久子, 三嶋理晃.: Functional MRI による咳の中核性機序の解析. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会ミニシンポジウム (2010.4.23-25 京都)
- 遠藤正樹, 建内宏重, 曾田直樹, 中村雅俊, 中井隆介, 東 高志, 市橋則明.: 大腰筋活動の定量化に適した部位と負荷量の検討 — MRI による筋断面積・筋厚の測定 —. 第 45 回日本理学療法学会大会 (2010.5.27-29 岐阜)
- 東 高志, 中井隆介, 小森芳秋, 琴岡憲彦, 滝沢 修, 玄 丞休.: 臨床用 1.5 テスラ MRI を用いたマウス心臓の Cine MRI 撮像. 第 38 回日本磁気共鳴医学会大会 (2010.10.1-3 筑波)
- 米盛由以子, 山内 文, 中井隆介, 東 高志, 菅沼信彦.: functional MRI を用いたヒト脳機能における性差の解析. 第 38 回日本磁気共鳴医学会大会 (2010.10.1-3 筑波)
- 加藤希理子, 玄 丞休, 北條正樹.: ステレオコンプレックスポリ乳酸を用いた骨固定材の開発と評価. 帝人 21 世紀フォーラム (2010.1.29-31 三島)
- 加藤希理子, 松村和明, 中島直喜, 北條正樹, 玄 丞休.: ステレオコンプレックスポリ乳酸繊維複合体を用いた骨固定材の開発. 日本バイオマテリアル学会 5 回関西若手研究発表会 (2010.8.6 京都)
- 加藤希理子, 松村和明, 中島直喜, 北條正樹, 玄 丞休.: ステレオコンプレックスポリ乳酸繊維複合体を用いた骨固定材の開発. 第 35 回複合材料シンポジウム (2010.10.13-14 広島)
- 加藤希理子, 松村和明, 中島直喜, 玄 丞休, 北條正樹.: ステレオコンプレックスポリ乳酸繊維複合体を用いた骨固定材の開発. 第 21 回バイオフロンティア講演会 (2010.11.12-13 金沢)
- 加藤希理子, 松村和明, 中島直喜, 北條正樹, 玄 丞休.: ステレオコンプレックスポリ乳酸繊維複合体を用いた骨固定材の力学特性評価. 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会 (2010.11.29-30 広島)
- 竹内敦史, 高山 了, 松村和明, 中島直喜, 玄 丞休.: 人工関節用超高分子ポリエチレンの放射線架橋による物性の向上. 日本バイオマテリアル学会第 5 回関西若手研究発表会 (2010.8.6 京都)
- 竹内敦史, 高山 了, 松村和明, 中島直喜, 玄 丞休.: 人工関節用超高分子ポリエチレンの放射線架橋による物性の向上. 第 32 回日本バイオマテリアル学会 (2010.11.29-30 広島)
- 田中基嗣, 八谷悠生, 北條正樹, 玄 丞休, 近田英一, 金原 勲.: 静水圧押出成形 HAp/PLLA 複合材料の圧縮破壊挙動に及ぼす加水分解の影響. 日本材料学会第 59 期学術講演会講演論文集, pp. 23-24. (2010.5.22-23 札幌)
- Tanaka, M., Hachiya, Y., Ishihara, W., Hojo, M., Hyon, S-H, Konda, M., Kimpara, I. : Influence of Hydrolytic Absorp-

tion on Compressive Deformation/Fracture Properties of Hydrostatic-pressure-extrusion-molded HAp/ PLLA Composite. Proceedings of The 6th International Workshop on Green Composites, pp. 190-193. (2010.11.25-27 Gumi)

東郷由弥子, 藤村和磨, 玄 丞休, 別所和久: 自己分解性を有する新しい医療用接着剤の口腔粘膜欠損への応用に関する試験的研究. 第41回日本口腔外科学会近畿地方会(2010.6.19 和歌山)

数佐洋美, 渋谷早俊, 中佐智幸, 大川新吾, 亀井豪器, 出家正隆, 安達伸生, 中島直喜, 玄 丞休, 越智光夫: 自己分解性を有する生体接着剤(LYDEX)の関節軟骨に対する接着性の検討.

The 25th Annual Research Meeting of the JOA (2010.10.15-17 京都)

藤村和磨, 東郷由弥子, 玄 丞休, 別所和久: 自己分解性を有する新しい医療用接着剤の口腔粘膜欠損への応用に関する基礎的研究. 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会(2010.10.16-18 千葉)

近藤政芳, 小林正典, 松村和明, 中島直喜, 玄 丞休: ポリエチレングリコールを用いた人工潤滑財の開発(基礎的トライボロジー特性の評価). 第37回日本臨床バイオメカニクス学会(2010.11.1-2 京都)

本田佳之, 小林正典, 松村和明, 中島直喜, 玄 丞休: PEGを用いた人工関節内潤滑財の開発(臨床応用における基礎研究). 第37回日本臨床バイオメカニクス学会(2010.11.1-2 京都)

内藤泰行, 河内明宏, 邵 仁哲, 中島直喜, 玄 丞休, 三木恒治: 腹腔鏡下腎部分切除術の断端止血における新規医療用接着剤(LYDEX)の有用性. 第48回日本人工臓器学会大会(2010.11.18-20 仙台)

## 2) 講演・シンポジウム

玄 丞休: 生分解性高分子ポリ乳酸の医療応用, 「プラスチック成形加工学会講演会」(招待講演)(2010.6.23. 東京)  
Suong-Hyu Hyon : Artificial meniscus of the polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel 「6th World Congress of Biomechanics」(依頼講演)(2010.8.5 Singapore)

Suong-Hyu Hyon : Development of DMSO/Serum-free cryopreservation system for stem cell, iPS Cell, and fertilizes ovum using antifreeze polyamino acid 「The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology」(招待講演)(2009.10.29 Daegu)

Suong-Hyu Hyon : Novel medical glue and its clinical application 「BIT'S Annual International Congress of Cardiology-2010」(依頼講演)(2010.12.9 Shanghai)

## ナノバイオメカニズム研究領域 Department of Nano-Biomechanism

助教 都賀谷紀宏

Assist. Prof. Toshihiro Togaya

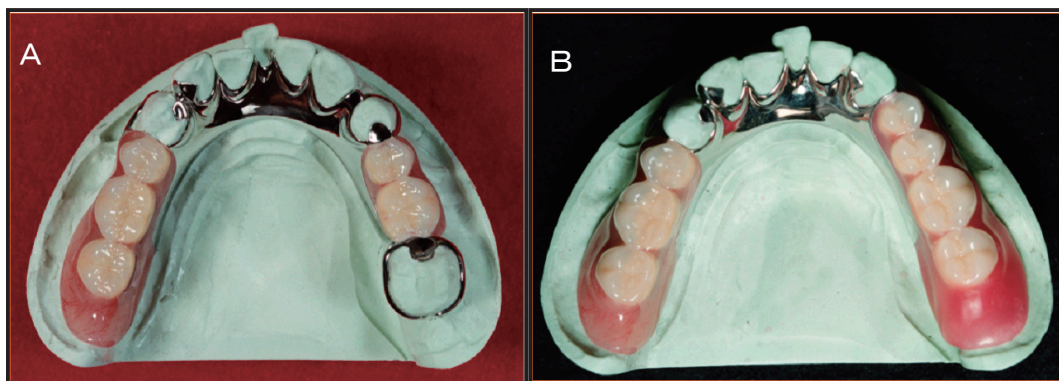
### 【研究概要】

歯の欠損は、歯科口腔機能の障害や低下のみならず、審美性の低下ももたらし、生活の質の低下にも結びつく。近年、高齢化に伴い、従来から用いられている義歯の需要も伸びてきている。また、欠損補綴分野でのインプラントの普及も著しいものがある。このような状況のなか、歯科補綴物の品質に対する要求はより高まってきており、特にインプラントのような人工歯根を用いた場合、その上部構造(義歯)には、高い精度が要求される。

本研究分野では、歯科補綴物に用いられる材料の成形加工法について、レーザー加工法を中心として検討し、生物学的適合性、力学的適合性および形態的適合性に優れた高精度歯科補綴物の製作システムについて研究している。また、これらの歯科補綴物製作を担当する歯科技工士の高齢化や若手技工士の離職率の高さが社会問題になりつつあり、熟練技工士の技術の伝承をいかに行うか、次世代の技工士をいかに養成するか、という社会学的問題についても検討している。

Restoration and maintenance of oral function (ingestion, mastication, swallowing and phonation) are essential for ADL (activity of daily living) and QOL (quality of life) especially in the elderly. The goal of our study is to establish the fabrication systems of precision dental prostheses, which have excellent biological-, mechanical- and morphological-compatibility.

On the other side, there is a big social problem in the manufacturing industry of the dental prostheses in Japan. The society tends to be composed by elderly dental technicians, and many young people in this field quit work because they do not feel financially stable. We are also investigating such a sociological problem.



レーザー加工によってリフォームされた義歯。鉤歯が抜歯されたため、この部分だけ義歯を作製し直し、旧義歯と接合した。これまでは一から作り直さなければならなかったものがリフォームで済み、患者の満足度も高い。

A：リフォーム前 B：リフォーム後

## 【業績目録】

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 講演・シンポジウム

都賀谷紀宏：レーザー溶接で変わるもの、変えられること，鶴見歯学会特別講演会(2010.6.24 横浜市)

都賀谷紀宏：パルス波形について，第21回歯科レーザープロセッシングフォーラム(2010.7.10 横浜市)

都賀谷紀宏：歯科技工士の“仕事”とは，第4回歯科レーザー溶接フォーラム(特別講演)(2010.23 高松市)

都賀谷紀宏：これからの学生教育と専門学校のあり方，第2回京都歯科医療技術専門学校学校役員・教員研修会(特別講演)(2011.1.20 京都市)

都賀谷紀宏：レーザー溶接と歯科技工パラダイムシフト，平成22年度横浜市歯科技工士会学術大会(2011.2.27 横浜市)

## バイオメカニクス研究領域 Department of Biomechanics

分野主任 教授 安達 泰治

*Prof. Taiji Adachi*

### 【研究概要】

本研究領域は、生体組織のリモデリングによる機能的適応・再生過程において、細胞が力学的刺激を感知し、その情報を組織・細胞のリモデリングに結びつけるメカニズムの解明を目指している。環境の変化に対する生体の適応的な応答現象は、マクロには生体組織の構造・機能の変化として現れるが、その理解には、細胞・分子レベルにおけるミクロな要素過程とそれらが形成するシステムとしての理解が重要となる。そこで我々は、生体の持つ「力学環境への適応性」と「構造・機能の階層性」に着目し、各種力学を基礎として、実験と数理モデリング・シミュレーションを統合的に組み合わせた研究を進めている。

#### (1) 骨のリモデリングによる機能的適応のバイオメカニクス

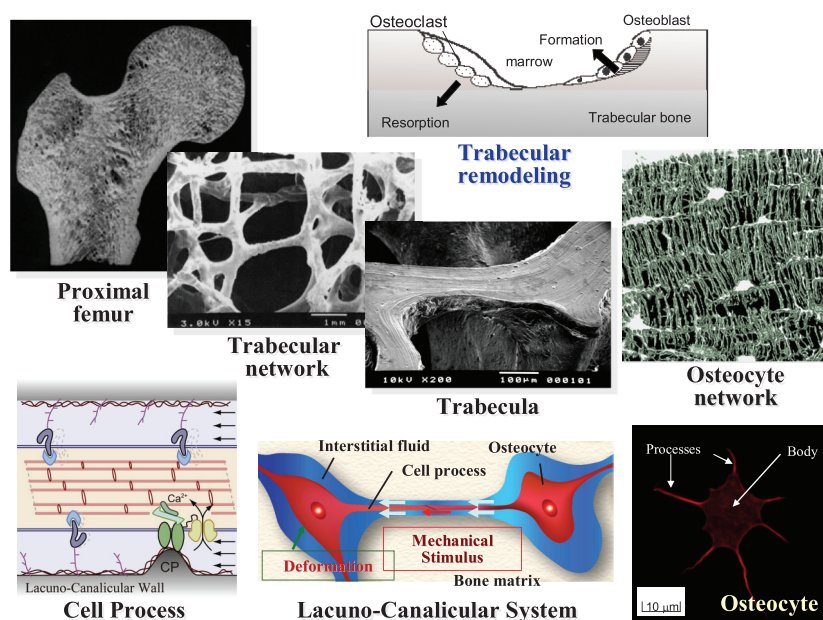
骨のリモデリングによる機能的適応現象において、骨基質内に存在する骨細胞が、メカノセンサーシステムの要素として重要な役割を果たしていると考えられている。骨に動的な荷重が作用した場合、骨基質の変形は骨小腔－骨細管システム内の間質液に流れを生じさせ、この流れにより骨細胞の細胞突起表面にせん断応力が生じることが予測される。このような力学的刺激が骨細胞の活動に大きく影響を与えることが知られており、骨細胞を骨の変形・力に対するメカノセンサーとして捉えることができる。さらに、骨細胞は、周囲の細胞群とネットワークを形成しており、感知した刺激情報を周囲、あるいは、骨のリモデリング表面に存在する細胞に伝達する機能を有していると考えられている。そこで本研究では、骨の適応的なリモデリングが、この骨細胞のメカノセンシングと情報伝達により調整されていると仮定し、マルチスケールバイオメカニクスの観点から骨梁リモデリングの数理モデルを提案した。この数理モデルを用いることで、例えば、繰返し単軸荷重を受ける骨梁が、リモデリングによりその方向を力の方向に変化させ、荷重支持構造体としての機能に見合うように形態を変化させていくことを示すことができた。この研究は、Wolffの仮説として古くから知られる骨のリモデリングによる機能的適応現象に対して、階層的な機構を明らかにするものである。

#### (2) 細胞運動におけるアクチン細胞骨格ネットワークダイナミクスのバイオメカニクス

細胞運動を駆動する様々な細胞内過程において、生化学的な因子と力学的な因子の相互作用が重要な役割を果たしている。これまで、細胞内におけるFアクチンネットワークのダイナミクスに関する多くの研究が進められてきたが、アクトミオシン収縮がどのように細胞内の時間・空間的な力の場を生み出し、それがどのように調和のとれた細胞運動へと繋がるのかについては、十分には理解されていない。そこで本研究では、蛍光スเปックルイメージング法と粒子像流速計測法を組み合わせることで、移動性細胞内のアクトミオシン活性に対する摂動が、葉状仮足におけるFアクチンネットワークの流れや変形場に与える影響を定量的に評価した。Fアクチンの流れ場は、先端端近傍における逆行性流れと細胞体近傍の移動方向の流れ、および、両者が出会う領域の圧縮変形により特徴付けられる。アクトミオシン活性化を調節した結果、この圧縮領域の流れの強さが変化すること、すなわち、細



胞内のFアクチンネットワークの流れと変形場が、能動的な力場に依存して調整されていることを見出すことができた。これらの結果は、移動性細胞内のFアクチンネットワークが、力学的に自己調節されたシステムであることを示すものであり、力学因子と生化学因子との相互作用が、細胞内のダイナミックな構造・機能変化に大きく影響を与えることを例示するものである。



図：骨のリモデリングによる機能的適応現象におけるバイオメカニクスとメカノバイオロジー：  
骨細胞のメカノセンシングから骨梁リモデリングによる海綿骨の構造・機能適応変化まで  
Fig: Biomechanics and mechanobiology of bone adaptation by remodeling:  
From mechanosensing at cellular level to functional adaptation at cancellous tissue level.

In functional adaptation by tissue remodeling and regeneration, the mechanism by which local mechanical cue is sensed by cells and tissues remodel their structure to meet their functional demands remains unclear because of the complex hierarchical system in spatiotemporal scales. To better understand the mechanoregulation of tissue adaptation by remodeling and regeneration, bridging spatial and temporal scales from microscopic molecular and cellular activities to macroscopic tissue behaviors is very important. Based on multiscale system biomechanics, our department is involved in integrated researches of modeling and simulation combined with experiments, focusing on mechano-biochemical couplings in the dynamics of structure-function relationships in tissues and cells.

### (1) Biomechanics of bone functional adaptation by remodeling

In bone functional adaptation by remodeling, osteocytes in the lacuno-canalicular system are believed to play important roles in the mechanosensory system. Under dynamic loading, bone matrix deformation generates an interstitial fluid flow in the lacuno-canalicular system; this flow induces shear stress on the osteocytic process membrane that is known to stimulate the osteocytes. In this sense, the osteocytes behave as mechanosensors, and deliver mechanical signals to neighboring cells through the intercellular communication network. In this study, bone remodeling is assumed to be regulated by the mechanical signals collected by the osteocytes. From the viewpoint of multiscale biomechanics, we proposed a mathematical model of trabecular bone remodeling that takes into account the osteocytic mechanosensory network system. Based on this model, a computational simulation of trabecu-

lar bone remodeling was conducted for a trabecula under cyclic uniaxial loading, demonstrating functional adaptation to the applied mechanical loading as a load-bearing construct.

## (2) Biomechanics of cytoskeletal actin network dynamics in migrating cells

Coupling interactions among mechanical and biochemical factors are important for the realization of various cellular processes that determine cell migration. Although F-actin network dynamics has been the focus of many studies, it is not yet clear how mechanical forces generated by actomyosin contractility spatiotemporally regulate this fundamental aspect of cell migration. In this study, using a combination of fluorescent speckle microscopy and particle imaging velocimetry techniques, we perturbed the actomyosin system and examined quantitatively the consequence of actomyosin contractility on F-actin network flow and deformation in the lamellipodia of actively migrating fish keratocytes. F-actin flow fields were characterized by retrograde flow at the front and anterograde flow at the back of the lamellipodia, and the two flows merged to form a convergence zone of reduced flow intensity. Interestingly, activating or inhibiting actomyosin contractility altered network flow intensity and convergence, suggesting that network dynamics is regulated directly by actomyosin contractility. Moreover, quantitative analysis of F-actin network deformation revealed that the deformation was significantly negative and predominant in the direction of cell migration. Furthermore, perturbation experiments revealed that the deformation was a function of actomyosin contractility. Based on these results, we suggest that the actin cytoskeletal structure is a mechanically self-regulating system, and we propose a detailed pathway for the spatiotemporal self-regulation of the actin cytoskeletal structure during cell migration. In the proposed pathway, mechanical forces generated by actomyosin interactions are central to the realization of the various mechanochemical processes that determine cell motility.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

Taiji Adachi, Yoshitaka Kameo, Masaki Hojo : Trabecular bone remodelling simulation considering osteocytic response to fluid-induced shear stress. *Phil. Trans. Roy. Soc. A*. **368** : 2669-2682(2010).

安達泰治, 島田義孝, 井上康博, 北條正樹 : アクチンフィラメントに対する結合タンパク質分子の接近挙動解析. *日本機械学会論文集*. **76**(8): 1119-1127(2010).

Shunsuke Baba, Takeomi Inoue, Yoshiya Hashimoto, Daisuke Kimura, Masatoshi Ueda, Kana Sakai, Naoyuki Matsumoto, Chiaki Hiwa, Taiji Adachi, Masaki Hojo : Effectiveness of scaffolds with pre-seeded mesenchymal stem cells in bone regeneration : assessment of osteogenic ability of scaffolds implanted under the periosteum of the cranial bone of rats. *Dent. Mat. J.* **29**(6): 673-681(2010).

Masaki Hojo, Kyosei Nakashima, Takayuki Kusaka, Mototsugu Tanaka, Taiji Adachi, Toshiyasu Fukuoka, Masayasu Ishibashi : Mode I fatigue delamination of Zanchor-reinforced CF/epoxy laminates. *Int. J. Fatigue*. **32**(1): 37-45(2010).

Masaki Hojo, Masaaki Mizuno, Thomas Hobbiebrunken, Taiji Adachi, Mototsugu Tanaka, Sung Kyu Ha : Geomet-

- rical range of microscopic stress distribution change due to fibre array irregularities for thermally and transversely loaded CF/epoxy composite. *Plastic, Rubber & Composite*. **39**(2): 99-106(2010).
- Masaki Hojo, Kenta Osawa, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue, Kozo Osamura, Shojiro Ochiai, Naoki Ayai, Kazuhiko Hayashi: Effect of fatigue loading on critical current in stainless steel-laminated DI-BSCCO superconducting composite tape. *Physica C*. **470**: 1373-1376(2010).
- Yasuhiro Inoue, Takeji Deji, Yoshitaka F, Masaki Hojo, Taiji Adachi: Simulations of dynamics of actin filaments by remodeling them in shear flows. *Comp Biol. & Med.* **40**(11/12): 876-882(2010).
- 井上康博, 松本迪斉, 北條正樹, 高田尚樹, 安達泰治, 石田和希: Phase-field Navier-Stokes モデルによる繊維間隙スケール樹脂流れにおける気液界面ダイナミクスの検討. *日本複合材料学会誌*. **36**(3): 94-103.
- Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Coarse-grained Brownian ratchet model of membrane protrusion on cellular scale. *Biomech. & Model Mechanobiol.* in press.
- Naoyoshi Kachi, Akihisa Otaka, Seungwoo Sim, Yoshihiko Kuwana, Yasushi Tamada, Junko Sunaga, Taiji Adachi, Naohide Tomita: Observation of chondrocyte aggregate formation and internal structure on Micropatterned fibroin-coated surface. *Bio-Med. Mat. & Eng.* **20**(1): 55-63(2010).
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Narumichi Sato, Masaki Hojo: Estimation of bone permeability considering morphology of lacuno-canalicular porosity. *J. Mech. Behav. Biomed. Mat.* **3**(3): 240-248(2010).
- Hiroshi Kamioka, Taiji Adachi: Application of bioimaging to osteocyte biology. *Clin. Rev. Bone & Min. Metabol.* in press.
- Shinji Matsushita, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue, Masaki Hojo, Masahiro Sokabe: Evaluation of extensional and torsional stiffness of single actin filaments by molecular dynamics analysis. *J. Biomech.* **43**(16): 3162-3167(2010).
- Hiromi Miyoshi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee; Dong Jin Cho; Jong Soo Ko, Yutaka Yamagata, Taiji Adachi: Control of highly migratory cells by microstructured surface based on transient change in cell behavior. *Biomater.* **31**(33): 8539-8545(2010).
- 野山義裕, 伊藤 宣, 安達泰治, 中村孝志: 人工足関節の力学的評価に基づく設計指針の検討. *臨床バイオメカニクス*. **31**: 117-122(2010).
- Kennedy Omondi Okeyo, Taiji Adachi, Masaki Hojo: Mechanical regulation of actin network dynamics in migrating cells. *J. Biomech. Sci. & Eng.* **5**(3): 186-207(2010).
- 田原大輔, 高野直樹, 安達泰治, 中野貴由: マルチスケール応力解析によるヒト椎体海綿骨の力学的評価. *日本骨形態計測学会誌*. **20**(1): S100-S107(2010).
- Hidetaka Yamaoka, Taiji Adachi: Coupling between axial stretch and bending/twisting deformation of actin filaments caused by a mismatched centroid from the center axis. *Int. J. Mech. Sci.* **52**(2): 329-333(2010).
- Hidetaka Yamaoka, Taiji Adachi: Continuum dynamics on a vector bundle for a directed medium. *J. Phys. A: Math. & Theor.* **43**(32): 325209(15pp) (2010).

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

Taiji Adachi: Biomechanics of actin cytoskeleton: *in vitro* and *in silico* studies. 次世代生命体統合シミュレーション

- ン研究, 脳神経系チームセミナー(2010.09.29 宇治)
- Taiji Adachi: Mechanical regulation of actin network dynamics in migrating cells: in vitro and in silico studies. Seminar at Pusan National University(2010.10.7-9 Pusan, Korea)
- 安達泰治: 細胞運動におけるアクチン細胞骨格構造システムのバイオメカニクス. 九州大学グローバル COE プログラム「未来分子システム科学」第 130 回セミナー(2010.11.25 福岡)
- 安達泰治: 骨のリモデリングによる機能的適応のシステムバイオメカニクス. 定量生物の会第 3 回年会(2010.11.26-28 東京)
- 出路丈時, 井上康博, 安達泰治, 北條正樹: アクチン重合による細胞膜突出のブラウン動力学シミュレーション. 日本機械学会第 23 回計算力学講演会(2010.9.23-25 北見)
- Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Mechanical detection of interaction between actin and Arp2/3 complex using AFM. 20<sup>th</sup> Anniversary World Congress on Biosensors(Biosensors 2010)(2010.5.26-28 Glasgow, UK)
- 長谷川正和, 清流正弘, 安達泰治, 山本照子: Beagle の  $\mu$ CT データの 3 次元有限要素解析を用いた矯正歯の移動シミュレーション. 第 69 回日本矯正歯科学会大会(2010.9.27-29 横浜)
- Masakazu Hasegawa, Taiji Adachi, Masaki Hojo, Teruko Takano-Yamamoto: Orthodontic tooth movement simulation using ct image-based human lower second premolar models. VPH2010(Virtual Physiological Human)(2010.9.30-10.1 Brussels, Belgium)
- 石田和希, 井上康博, 北條正樹, 安達泰治, 高田尚樹: Immersed Boundary 法と拡散界面法との連成による単繊維周りの樹脂流れ解析. 日本機械学会第 23 回計算力学講演会(2010.9.23-25 北見)
- Yasuhiro Inoue, Michihito Matsumoto, Masaki Hojo, Kazuki Ishida, Naoki Takada, Taiji Adachi: Microscale Simulation of Resin-Air Flow around Single Fibers. 10th International Conference on Flow Processes in Composite Materials(FPCM10)(2010.7.11-15 Ascona, Switzerland)
- Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Masaki Hojo: Theoretical study on mechanochemical modulation of binding between actin and its accessory proteins: A thermodynamics perspective. World Congress on Biomechanics(WCB 2010)(2010.8.1-6 Singapore)
- 井上康博, 津田峻佑, 安達泰治, 北條正樹: アクトミオシンネットワークにおけるダイナミックな構造変化のシミュレーション. 日本機械学会 2010 年度年次大会(2010.9.5-9 名古屋)
- 井上康博, 安達泰治, 北條正樹: アクトミオシンネットワークの収縮力はミオシン濃度のべき乗則に従う. 日本機械学会第 23 回計算力学講演会(2010.9.23-25 北見)
- Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Modeling and simulation of dynamic reconstructing network of stress fibers with mechanical sensing through focal adhesions. 日本生物物理学会第 48 回年会(2010.9.20-22 仙台)
- 石橋弘輝, 亀尾佳貴, 安達泰治, 北條正樹: 細胞間を伝播するシグナル分子の影響を考慮した骨梁リモデリングシミュレーション. 日本機械学会第 21 回バイオフロンティア講演会(2010.11.12-13 金沢)
- 伊藤 宣, 野山義裕, 安達泰治, 中村孝志: 足関節周囲の骨支持性を考慮した人工足関節の検討. 第 37 回日本臨床バイオメカニクス学会(2010.11.1-3 京都)
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Masaki Hojo: Morphological changes in cancellous bone predicted by trabecular remodeling simulation considering interstitial fluid flow. The 17<sup>th</sup> Congress of the European Society of Biomechanics(ESB2010)(2010.7.5-8 Edinburgh, UK)
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Masaki Hojo: Repairing simulation of damaged trabecula based on mathematical

- model for bone remodeling. World Congress on Biomechanics(WCB2010) (2010.8.1-6 Singapore)
- 亀尾佳貴, 安達泰治, 北條正樹: 骨細胞アポトーシスを有する骨梁の損傷修復シミュレーション. 日本機械学会第23回計算力学講演会(2010.9.23-25 北見)
- Shinji Matsushita, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue, Masaki Hojo, Masahiro Sokabe: Quantitative evaluation of mechanical behaviors of actin filament under different mechanical conditions. World Congress on Biomechanics (WCB2010) (2010.8.1-6 Singapore)
- 松下慎二, 安達泰治, 井上康博, 北條正樹, 曾我部正博: 分子動力学法を用いたアクチンフィラメントの引張・ねじり剛性評価. 日本機械学会. 日本機械学会 2010 年度年次大会(2010.9.5-9 名古屋)
- Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Masaki Hojo, Masahiro Sokabe, Taiji Adachi: Tensile force suppresses torsional motions of individual actin subunits. 日本生物物理学会第 48 回年会(2010.9.20-22 仙台)
- 松下慎二, 安達泰治, 井上康博, 北條正樹, 曾我部正博: 張力作用下におけるアクチンフィラメントの分子間相互作用解析. 日本機械学会第 23 回計算力学講演会(2010.9.23-25 北見)
- 南 貴信, 安達泰治, 北條正樹, 中野貴由: 椎間板変性が椎体海綿骨リモデリングに及ぼす影響: シミュレーションによる検討. 日本機械学会第 23 回計算力学講演会(2010.9.23-25 北見)
- Hiromi Miyoshi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Taiji Adachi, Yutaka Yamagata: Control of cell migration on-chip by micron-sized deep and narrow grooves in a square pattern. 20<sup>th</sup> Anniversary World Congress on Biosensors(Biosensors 2010) (2010.5.26-28 Glasgow, UK)
- Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi: Spatial scale-dependent correlations between cell peripheral activity and shape. 日本生物物理学会第 48 回年会(2010.9.20-22 仙台)
- 三好洋美, 朱 正明, 山形 豊, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, 安達泰治: マイクロ構造化表面を利用した接着性細胞フィルタリング基質の開発. 日本機械学会第 2 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム(2010.10.13-15 松江)
- Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi: Multiscale characteristics of protrusion and retraction activities in lamellipodium. The 4th Mechanobiology Workshop and Biophysical Society Joint Meeting(2010.11.9-11 Singapore)
- 村田勝章, 須長純子, 北條正樹, 佐藤正明, 安達泰治: 骨細胞の一酸化窒素産生における力刺激依存性. 日本機械学会第 21 回バイオフロンティア講演会(2010.11.12-13 金沢)
- 長崎益三, Okeyo Kennedy Omondi, 須長純子, 北條正樹, 小寺秀俊, 安達泰治: 細胞伸展ダイナミクスに与えるアクトミオシン収縮力の役割: マイクロパターンによる検討. 日本機械学会 2010 年度年次大会(2010.9.5-9 名古屋)
- 中川光司, 井上康博, 安達泰治, 北條正樹: 粗視化分子動力学モデルを用いたアクトミオシンフィラメント系の構造変化のシミュレーション. 日本機械学会第 21 回バイオフロンティア講演会(2010.11.12-13 金沢)
- 野山義裕, 伊藤 宣, 安達泰治, 中村孝志: 距骨下関節固定型人工足関節の力学的評価. 第 37 回日本臨床バイオメカニクス学会(2010.11.1-3 京都)
- Shukei Sugita, Taiji Adachi, Yosuke Ueki, Masaaki Sato: Development of method for measuring tension generated in cytoskeleton. 第 49 回日本生体医工学会大会(2010.6.25-27 大阪)
- Shukei Sugita, Taiji Adachi, Yosuke Ueki, Masaaki Sato: Direct measurement of tension generated in cytoskeleton. World Congress on Biomechanics(WCB2010) (2010.8.1-6 Singapore)
- 田原大輔, 安達泰治: 再構築による骨梁形態変化を考慮した骨梁骨の力学的特性評価. 第 37 回日本臨床バイオメ

カニクス学会(2010.11.1-3 京都)

Ken-ichi Tsubota, Yusuke Suzuki, Tomonori Yamada, Masaki Hojo, Akitake Makinouchi, Taiji Adachi: Trabecular surface remodeling simulation in human proximal femur using large-scale voxel FE models: Approach to understanding Wolff's law. World Congress on Biomechanics(WCB2010) (2010.8.1-6 Singapore)

Hidetaka Yamaoka, Taiji Adachi: Geometrical settings of directed medium by vector bundle description and its application to biomechanics. 47<sup>th</sup> Annual Technical Meeting of Society of Engineering Science(2010.10.04-06 Ames, USA)

## 2) 講演・シンポジウム

Taiji Adachi, Yoshitaka Kameo, Masaki Hojo: Modeling of mechanosensing and intercellular communications by osteocytes in trabecular bone adaptation. IV European Conference on Computational mechanics(ECCM 2010) (2010.5.16-21 Paris, France) (Keynote Talk)

Taiji Adachi: Modeling of osteocyte mechanosensing and communication in bone adaptation. Symposium: Cellular Mechanics in Embryogenesis, 43<sup>rd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (2010.06.20-23 Kyoto)

Taiji Adachi, Masuzo Nagasaki, Kennedy O. Okeyo, Junko Sunaga, Masaki Hojo, Hidetoshi Kotera: Quantitative analysis of lamellipodial protrusion dynamics on a micropatterning substrate. 第49回日本生体医工学会大会, シンポジウム「デバイス技術による細胞解析・制御の最前線」(2010.6.25-27 大阪)

安達泰治: 骨細胞の力学刺激感知と細胞間応答伝播. 第22回日本運動器リハビリテーション学会, シンポジウム「物理刺激と運動器系細胞の応答」(2010.7.10 仙台)

Taiji Adachi, Yoshitaka Kameo, Masaki Hojo: Multiscale simulation of trabecular bone adaptation by remodeling toward understanding Wolff's law. The 9<sup>th</sup> World Congress on Computational Mechanics and 4<sup>th</sup> Asian Pacific Congress on Computational Mechanics(WCCM/APCOM2010) (2010.7.19-23 Sydney, Australia) (Keynote Talk)

安達泰治: 骨の「かたち」は力に応じて変化する. 京都大学再生医科学研究所第5回公開講演会, 「身体と再生－細胞から細胞社会へ－」(2010.7.24 京都)

Taiji Adachi, Yoshitaka Kameo, Masaki Hojo: Modelling osteocyte signalling in bone tissue adaptation. World Congress on Biomechanics(WCB2010) (2010.8.1-6 Singapore) (Invited Talk)

安達泰治: 骨のリモデリングによる機能的適応のバイオメカニクス. 第86回岡山県医用工学研究会.(2010.10.20 岡山) (特別講演)

安達泰治: 骨の機能的適応のシステムバイオメカニクス. 第23回京滋骨粗鬆症研究会.(2010.10.23 京都) (特別講演)

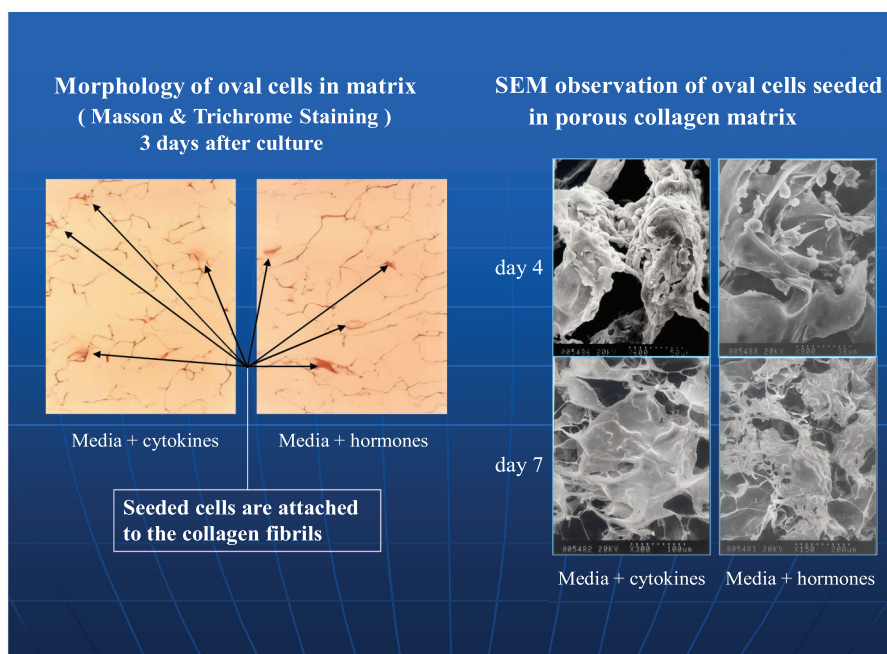
安達泰治: 骨のリモデリングによる機能的適応のシステムバイオメカニクス. 第37回日本臨床バイオメカニクス学会(2010.11.1-3 京都) (教育研修講演)

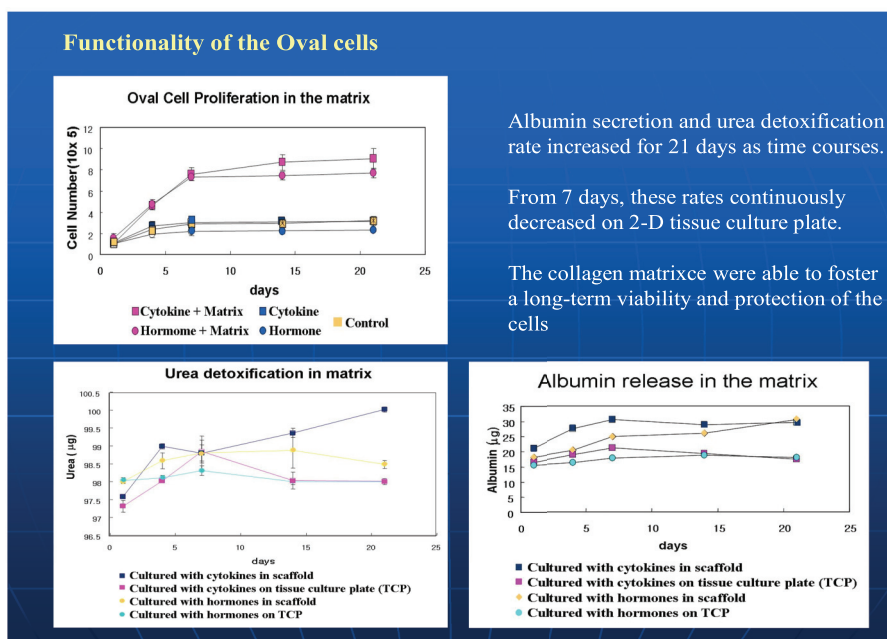
## 再生医工学研究領域 Department of Medical Engineering

Visiting Professor, Hwal SUH

### 【研究概要】

The main theme of this department is to design an artificial extracellular matrix that mimics natural environment of tissue providing a favorable niche to commit bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) toward specific tissue. In general, MSC differentiation committed by growth factors may be improper due to possibility of clinical risk of inducing oncogenesis, and we have previously developed a growth-factor-free coculture method and observed rat MSCs differentiated into hepatic progenitor cells. This study was aimed to validate hepatic differentiation potential *in vivo*. MSCs from bone marrow of green fluorescent protein-transgenic Sprague-Dawley rats were cocultured with hepatocytes from normal Sprague-Dawley rats, sharing growth-factor-free media. After 14 days, cells were implanted into the spleen of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-injured rats and kept for 4 weeks. Fibrosis remarkably decreased in CCl<sub>4</sub>/cocultured MSC at weeks 1, 3, and 4. Immunohistochemistry revealed that albumin, α-fetoprotein, and cytokeratin 19 (CK19) expression was high in CCl<sub>4</sub>/cocultured MSC only at week 1. Reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot revealed that CCl<sub>4</sub>/cocultured MSC had reduced α-fetoprotein expression at week 4, whereas CK18 and CK19 exhibited stronger expression. Albumin in CCl<sub>4</sub>/cocultured MSC increased at week 4 only in protein level. We assume that cocultured MSCs had stayed at hepatic progenitor stage until week 3, and differentiated into hepatocytes or bile-ductal epithelial cells afterward. Hepatic progenitor cells, oval cells in the other term, from MSC differentiation in the growth-factor-free coculture system may contribute to the therapeutic effect for liver disease *in vivo*.





The obtained oval cells were hybridized with a porcine Type 1 collagen and hyaluronic acid composite porous membrane that is designed to mimic structural component of the liver extracellular matrix, and cultured in William's medium with supplement of cytokines (containing growth factors of HGF+EGF) or hormones (insulin+dexamethasone+hydrocortisone) for 3 weeks. The result demonstrated that cells in hormonal environment differentiated toward hepatocytes as cytokine supplemented media and the hybridized collagen-hyaluronic acid membrane were able to foster a long term viability.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

- Li, T., Kim, J., Cho, H., Lee, H., Kim, K., Lee S., SUH, H. : Therapeutic Potential of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiated with Growth-Factor-Free Coculture Method in Liver-Injured Rats. *Tissue Eng. Part A*. 16(8): 2649-2659(2010)
- Baik, S., Kim, J., Cho, H., Park, S., Kim, Y., SUH, H. : Development and Analysis of a Collagen-Based Hemostatic Adhesive. *J Surg Res*. 164 : 221-228(2010)



## 技 術 部

### Division of Technical Support

#### 【研究支援概要】

2010 年は 1 月より 12 月末までに 9 分野 238 件の利用があり、再生実験試料等の特殊な組織標本作製なども含め、個々の研究者の要望に応えてきた。また、固定、包埋から染色、封入までの病理組織標本作製や免疫染色などの技術指導も行ってきた。

- ・パラフィン切片作製、凍結切片作製、ブロックの作製、脱灰標本の作製
- ・一般染色 (Hematoxylin-Eosin stain)
- ・特殊染色 (Azan stain, Alcian blue stain, Berlin blue stain, Dahl's method, Elastica-Van Gieson stain, Giemsa stain, Kluver-Barrera stain, Masson's trichrome stain, Maxwell's stain, Nissl's stain, PTAH, Toluidine blue stain, Safranin O-Fast green stain, Villanueva bone stain, von Kossa's method, Silver stain)
- ・免疫染色 ( $\alpha$ SMA, Desmin, vWF VIII, Vimentin, CD68, CD31, EP2, Collagen type-I, Type-II, MAP2, HBME-1, GFP, Cytokeratin 等)

自己研鑽として京都大学技術職員研修(第 4 専門技術室)、実験病理組織技術研究会第 17 回総会・学術集会、実験病理組織技術研究会第 8, 9 回関西西部会技術研修会、第 25 回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会研究発表会に参加し、情報収集や技術交流を行ってきた。又、労働安全衛生教育研修や廃液・廃棄物研修、パソコン研修を受けてきた。

#### 【業績目録】

##### ◆ 誌上発表 ◆

Umezawa M., Higuchi K., Mori M., Matsushita T., Hosokawa M. : Effect of dietary unsaturated fatty acids on senile amyloidosis in senescence-accelerated mice. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 64: 646-652 (2009)

##### ◆ 研修会発表 ◆

三好貴子, 位坂清継, 石井三和子, 今田輝義, 上田耕平, 岡本 豊, 金林智倫, 木村正美, 国遠かおり, 合田真貴, 穴戸隆男, 篠宮克彦, 中野健二, 平井加津子, 前田圭子, 松下隆寿, 松本正博, 宮本由美子, 宗岡篤信: 病理組織標本作製に関わる廃液の処理について(関西西部会報告)-14 施設アンケート集計結果-, 実験病理組織技術研究会 第 9 関西技術研究会 (2010.10.01) 大阪

## 4. ナノメディシン融合教育ユニット

### Nano-Medicine Merger Education Unit

ナノメディシン融合教育ユニットは、ナノテクノロジーとライフサイエンス、並びに医学が融合して初めて実現できる「ナノメディシン」という新しい先端医工学領域において、将来、産学官で活躍できる人材を育成することを目的として開設された教育組織です。

このユニットは京都大学の部局を横断した組織として位置づけられ、医学研究科、工学研究科及び再生医科学研究所が互いに連携しながら運営されます。教育においては既存の研究科・専攻という教育体系の枠組みを越えて、京都大学の豊富な教員スタッフと新たに採用された特任教員とが融合教育ユニットを形成してプログラムをコーディネートし、基礎知識、基礎技術の実習教育、研究指導に当たります。

既に産官で研究者、技術者として活躍されている社会人にナノメディシンに関する基礎知識を講義により提供するとともに、基礎実習及び演習などの実技による再教育を行います。これにより、新領域において問題解決能力をもつ人材へと育成します。

We are proud of foundation of Nano-Medicine Merger Education Unit, which is an educational organization with the aim of nurturing talented experts who can drive translational research, display issue-solving ability, and create next-generation industry in terms of “nano-medicine” generated only by merger of nano-technology, life science, and medicine.

The unit is crossing over Graduate School of Medicine, Graduate School of Engineering, and Institute for Frontier Medical Sciences to make abundant human resources of Kyoto University and new designated researchers grow together, as the result of which we can provide coordinated and fundamental education programs efficiently.

It is an ultimate goal of this unit to contribute to nurturing talent with issue-solving ability in new fields by providing practice and basic lecture about nano-medicine for experts in engineering and research in a specific field.

## 5. 学術集会

### 京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 平成 22 年度 学術講演会

開催日：2010 年 12 月 13 日(月)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 所長 坂口 志文(京都大学再生医科学研究所)

#### セッション 1

座長：松岡 雅雄(京都大学ウイルス研究所 所長)

「間葉系幹細胞を用いた再生医療の実践」

戸口田 淳也 (京都大学再生医科学研究所 教授)

「筋・腱・軟骨の発生と再生における遺伝子ネットワーク」

浅原 弘嗣(国立成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部 部長)

ポスターセッション

#### セッション 2

座長：西田 栄介(京都大学大学院生命科学研究科 教授)

「骨髄の造血幹細胞・前駆細胞を維持するニッチ～その実体と機能～」

長澤 丘司(京都大学再生医科学研究所 教授)

「破骨細胞分化シグナルと骨免疫学」

高柳 広(東京医科歯科大学分子情報伝達学 教授)

「iPS/ES 細胞を用いた免疫細胞療法の開発」

千住 覚(熊本大学大学院生命科学研究部 准教授)

閉会の挨拶 副所長 岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所)

## 【ポスターセッション】

## ポスター 1

小胞体関連分解における HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体の機能

細川 暢子

## ポスター 2

転写初期段階におけるクロマチン関連因子を核とした因子間ネットワークの解明

法邑 賢一, 平芳 一法

## ポスター 3

Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞による免疫抑制のメカニズム

山口 智之, 坂口 志文

## ポスター 4

Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis

橋本 求, 坂口 志文

## ポスター 5

光音響イメージングのための DDS 化インドシアニングリーン (ICG) の作製

城 潤一郎, 森田 美枝, ○山本 雅哉, 田畑 泰彦, 南 昌人, 湯浅 聡, 矢野 哲哉

## ポスター 6

Synergistic Effect of Stromal Cell-Derived Factor-1 and Bone Morphogenetic Protein-2 Released from Gelatin Hydrogels for In Vivo Bone Regeneration  
○Juthamas Ratanavaraporn, Hiroyuki Furuya, Yasuhiko Tabata

## ポスター 7

2-D and 3-D cell patterning using oligo(deoxyribonucleotide)s

Yuji Teramura, Naohiro Takemoto, Kengo Sakurai, Hiroo Iwata

## ポスター 8

Protein engineering approaches for stem cell-based therapy of central nervous disorders

Koichi Kato, Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Shuhei Konagaya, Edgar Yuji Egawa, Makiko Hiraoka, Hiroo Iwata

## ポスター 9

TCRβ 鎖遺伝子で 2 種類ある DJ allele から V to DJ 再構成がおこる効率は同じではない

藤本 真慈

## ポスター 10

遺伝子改変マウスを用いたホスホリパーゼ B/リパーゼの生理的機能の解析

竹村 浩昌

## ポスター 11

血管形成におけるオピオイドの新しい役割 (Novel roles of opioids in vascular formation)

山水 康平

## ポスター 12

体細胞の iPS 細胞化の運命を左右するリプログラミング因子 Sox2

山口 新平

## ポスター 13

ステレオコンプレックスポリ乳酸繊維を用いた複合材料の評価

加藤 希理子

## ポスター 14

耐摩耗性に優れた超高分子量ポリエチレンの人工関節摺動部材

竹内 敦史

## 京都大学再生医科学研究所第1回生命科学セミナー

開催日：2010年9月7日(火)

場 所：iPS細胞研究所1階 講堂

開会の辞

座長：長澤 丘司(再生医科学研究所 生体システム制御学分野 教授)

「脳神経回路の発生・再生を制御する分子細胞基盤」

榎本 和生(大阪バイオサイエンス研究所 神経細胞生物学部門 研究部長)

「プログラム非依存的な小脳ニューロン樹状突起パターンの制御」

見学 美根子(京都大学 物質-細胞統合システム拠点 准教授)

座長：開 祐司(再生医科学研究所 生体分子設計学分野 教授)

「造血幹細胞からT前駆細胞に至る系列決定の過程-分化停止/自己複製誘導による分化のチェックポイントの可視化-」

河本 宏(理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫発生研究チーム チームリーダー)

「ゲノムから疾患へヒト遺伝学(human genetics)を出発点とする疾患遺伝子と分子病態の解明」

池川 志郎(理化学研究所ゲノム医科学研究センター骨関節疾患研究チーム チームリーダー)

閉会の辞

## 分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2010. 1.13	昌子 浩登 (京都府立医科大学大学院 生命情報科学)	非平衡 3 次元パターン	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2010. 1.18	上住 聡芳 (藤田保健衛生大学総合医科学 研究所)	骨格筋内脂肪の形成に寄与する間葉系 前駆細胞の固定	再生増殖制御学分野 セミナー	再生増殖制御学分野
2010. 2. 2	George Q.Daley (Children's Hospital Boston)	Common themes in reprogramming, development, and cancer	第 18 回再生誘導セ ミナー	再生誘導研究分野
2010. 2. 5	池川 志郎 (理化学研究所遺伝子 多型研究センター)	医科遺伝学による骨関節疾患の研究	京都大学再生医科学 研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2010. 2.18	小守 壽文 (長崎大学大学院医歯薬学 総合研究科)	骨芽細胞分化と血管新生	京都大学再生医科学 研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2010. 2.23	小川 誠司 (東京大学大学院医学系研究科)	iPS 細胞におけるゲノム不安定性の評 価	第 19 回再生誘導セ ミナー	再生誘導研究分野
2010. 6.18	手老 龍吾 (自然科学研究機構分子科学 研究所)	平面支持脂質二重膜：その形成過程、 構造と分子拡散挙動の観察	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2010. 8.19	後藤 聡 (慶應義塾大学医学部)	膜・分泌蛋白質の翻訳後修飾の制御と その役割	再生増殖制御学分野 セミナー	再生増殖制御学分野
2010. 9.10	Kenneth M. Kozloff (Department of Orthopaedic Surgery and Biomedical En- gineering, University of Michigan, USA)	Molecular Imaging of Bone Metabo- lism and Skeletal Drug Delivery	第 1 回バイオメカニ クスセミナー	バイオメカニクス 研究領域
2010. 9.17	Feroz R. Pera (University of California, USA)	New Approaches to Measure and Re- duce Endoplasmic Reticulum Stress	第 1 回細胞機能調節 学セミナー	細胞機能調節学分野
2010. 9.29	YUN, Huisuk (Korea Institute of Materials Science)	Design of nanoporous bioactive ce- ramics for bone tissue regeneration	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2010. 9.29	TAE, Giyoong (Gwangju Institute of Sci- ence and Technology)	Heparin-based hydrogels for cell cul- ture/tissue engineering	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2010.10. 1	吉田 秀朗 (兵庫県立大学大学院生命理 学研究科)	小胞体ストレス応答とゴルジ体スト レス応答	第 2 回細胞機能調節 学セミナー	細胞機能調節学分野
2010.10.22	Denitsa Docheva (Laboratory for Experimen- tal Surgery and Regenera- tive Medicine, Department of Surgery, Clinical Centre Uni- versity of Munich, Germany)	Tendon-specific mesenchymal stem cells: definition, functions and clinical impact.	京都大学再生医科学 研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2010.11.17	岩橋 好昭 (山口大学大学院医学系研究 科応用分子生命科学専攻)	アメーバ様細胞の基質牽引力を媒介と する自律的な極性形成	第 2 回バイオメカニ クスセミナー	バイオメカニクス 研究領域
2010.11.22	山田 健太 (東京理科大学基礎工学研究 科)	ショウジョウバエ Deltex は Notch の 小胞輸送を介して Notch シグナル活 性化を制御する	再生増殖制御学分野 セミナー	再生増殖制御学分野
2010.11.24	Shuichi Takayama	Engineering Cellular Microenviron- ments Using Microfluidics	組織修復セミナー	組織修復材料学分野

## 京都大学再生医科学研究所「若手研究交流会」

開催日：2010年12月13日(月)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 所長 坂口 志文(京都大学再生医科学研究所)

セッション1 座長：飯田 敦夫(再生増殖制御学分野)  
竹村 浩昌(附属再生実験動物施設)

血液循環開始における ADAM8 のはたらき

飯田 敦夫(再生増殖制御学分野)

遺伝子改変マウスを用いたホスホリパーゼ B/リパーゼの生理的機能の解析

竹村 浩昌(附属再生動物実験施設)

iPS 細胞化の運命を左右するリプログラミング因子 Sox2

山口 新平(幹細胞加工研究領域)

Chondromodulin-I の血管内皮細胞特異的な作用とその活性ドメインの構造

三浦 重徳(生体分子設計学分野)

セッション2 座長：山口 新平(幹細胞加工研究領域)  
中路 正(組織修復材料学分野)

ヒト iPS 細胞からのドーパミン神経細胞誘導と霊長類モデル脳への移植

菊地 哲広(生体修復応用分野)

ヒト ES 細胞由来心筋細胞の長期拍動性維持と心機能の成熟化

尾辻 智美(霊長類胚性幹細胞研究領域)

ラット心筋梗塞モデルに対するマウス ES 細胞由来心臓組織シート移植

升本 英利(幹細胞分化制御研究領域)

ヒト新規レクチン XTP3-B が担う新たな小胞体品質管理機構

藤森 力(細胞機能調節学分野)

セッション3 座長：三浦 重徳(生体分子設計学分野)  
廣澤 幸一郎(ナノバイオプロセス研究領域)

超音波応答型ナノ DDS の血栓症治療への応用

上杉 佳子(生体材料学分野)

1 分子追跡法による IgE 受容体のシグナル変換機構の解明

廣澤 幸一郎(ナノバイオプロセス研究領域)

Prevention of complement activation by immobilization of soluble complement receptor 1 onto islet surface

Luan, Minh Nguyen(組織修復材料学分野)

EP2 アゴニストを用いた軟骨再生

三井 裕人(組織再生応用分野)

Chitosan hydrogel as an immunoisolative barrier for xenogeneic islet transplantation

Kai-Chiang Yang(器官形成応用分野)

## 【ポスターセッション】

- ポスター1  
血液循環開始における ADAM8 のはたらき 飯田 敦夫(再生増殖制御学分野)
- ポスター2  
Chondromodulin-I の血管内皮細胞特異的な作用とその活性ドメインの構造 三浦 重徳(生体分子設計学分野)
- ポスター3  
ヒト iPS 細胞からのドーパミン神経細胞誘導と霊長類モデル脳への移植 菊地 哲広(生体修復応用分野)
- ポスター4  
ヒト ES 細胞由来心筋細胞の長期拍動性維持と心機能の成熟化 尾辻 智美(霊長類胚性幹細胞研究領域)
- ポスター5  
ラット心筋梗塞モデルに対するマウス ES 細胞由来心臓組織シート移植 升本 英利(幹細胞分化制御研究領域)
- ポスター6  
ヒト新規レクチン XTP3-B が担う新たな小胞体品質管理機構 藤森 力(細胞機能調節学分野)
- ポスター7  
超音波応答型ナノ DDS の血栓症治療への応用 上杉 佳子(生体材料学分野)
- ポスター8  
1 分子追跡法による IgE 受容体のシグナル変換機構の解明 廣澤 幸一郎(ナノバイオプロセス研究領域)
- ポスター9  
Prevention of complement activation by immobilization of soluble complement receptor 1 onto islet surface  
Luan, Minh Nguyen(組織修復材料学分野)
- ポスター10  
EP2 アゴニストを用いた軟骨再生 三井 裕人(組織再生応用分野)
- ポスター11  
Chitosan hydrogel as an immunoisolative barrier for xenogeneic islet transplantation  
Kai-Chiang Yang(器官形成応用分野)
- ポスター12  
マクロファージの分化・移動における ADAM8 の役割と機能の解明 西邨 大吾(再生増殖制御学分野)
- ポスター13  
ゼブラフィッシュをもちいた血管血球相互作用の分子基盤 坂口 和弥(再生増殖制御学分野)
- ポスター14  
骨細胞の流れ刺激にともなう骨梁リモデリングのバイオメカニクス 亀尾 佳貴(バイオメカニクス研究領域)
- ポスター15  
キナーゼ阻害剤存在下でのヒト iPS 細胞の培養 長田 翔伍(幹細胞加工研究領域)
- ポスター16  
多能性幹細胞における染色体数の釣り合い 平野 邦生(幹細胞加工研究領域)
- ポスター17  
ヒト ES 細胞における生理活性分子の同定を目的とした high content analysis(HCA)  
熊谷 英明(霊長類胚性幹細胞研究領域)
- ポスター18  
Behavior of recruited PKC molecules on the cytoplasmic surface of the plasma membrane as studied by single-molecule tracking  
Min Xie(ナノバイオプロセス研究領域)
- ポスター19  
生体吸収性ゼラチン粒子を含んだ細胞集合体の作製 田島 脩平(生体材料学分野)
- ポスター20  
iPS 細胞を用いた難治性骨疾患への取り組み 松本 佳久(組織再生応用分野)
- ポスター21  
人工膝の移植部位として的大腿骨腔の有用性；糖尿病犬における in vivo 実験 Kai-Chiang Yang(器官形成応用分野)
- ポスター22  
生殖幹細胞から減数分裂開始を再現する培養実験系とシグナル伝達制御 細川美穂子(発生分化研究分野)



## International Symposium “Life of Proteins” in honor of the 1<sup>st</sup> Retirement of Professor Kazuhiro Nagata

March 18<sup>th</sup>, 2010, at Inamori hall, Kyoto University

### Program

Opening Remarks : Nobuko Hosokawa (Kyoto University)

1<sup>st</sup> session : chairman Kazutoshi Mori (Kyoto University)

Richard Morimoto (Northwestern University, USA)

Proteostasis : Guardian of the Proteome in Health and Disease

Koreaki Ito (Kyoto Sangyo University)

Structure, Function and Regulation of the Sec Translocation System

2<sup>nd</sup> session : chairman Toshiya Endo (Nagoya University)

Ulrich Hartl (Max Plank Institute of Biochemistry, Germany)

Protein Folding in the Cell : The Role of Molecular Chaperones

Masasuke Yoshida (Kyoto Sangyo University)

What's Going on Inside the Folding Cage of Chaperonin?

3<sup>rd</sup> session : chairman Tamotsu Yoshimori (Osaka University)

Kenneth Yamada (National Institute of Health/NIDCR, USA)

Dynamics of Cell Migration and Development

Kazuhiro Nagata (Kyoto University)

Life of Proteins along with My Life

Closing Remarks : Jun Hoseki (Kyoto University)

## 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究 細胞の運命と挙動を支配する細胞外環境のダイナミズム 平成 21 年度第 2 回班会議

開催日 : 2010 年 2 月 17 日 (水) ~ 18 日 (木)

場 所 : ホテルフジタ京都

### 2010 年 2 月 17 日 (水)

〈第一部班会議〉 座長 長澤 丘司

長澤 丘司 (京都大学再生医科学研究所)

相賀 裕美子 (国立遺伝学研究所系統生物研究センター)

〈Cutting Edge 講演〉 座長 相賀 裕美子

高田 慎治 (大学共同利用機関法人 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)

「細胞外環境における Wnt タンパク質の挙動 : これからの課題」

榎本 和生 (国立遺伝学研究所新分野創造センター)

「神経ネットワークの形成・維持・再編を司る細胞外マトリックス・ダイナミクス」

〈第二部班会議〉 座長 瀬原 淳子

高木 淳一 (大阪大学蛋白質研究所)

松野 健治 (東京理科大学基礎工学部)

平澤 恵理 (順天堂大学大学院医学研究科)

〈第三部班会議〉 座長 高木 淳一

関口 清俊 (大阪大学蛋白質研究所)

西脇 清二 (関西学院大学理工学部)

渡邊 利雄 (奈良女子大学大学院人間文化研究所)

全体班会議

### 2010 年 2 月 18 日 (木)

〈第四部班会議〉 座長 高田 慎治

五嶋 良郎 (横浜市立大学大学院医学研究科)

服部 光治 (名古屋市立大学大学院薬学研究科)

瀬原 淳子 (京都大学再生医科学研究所)

服部 浩一 (東京大学医科学研究所)

## 京都大学再生医科学研究所平成 21 年度共同研究会

開催日：2010 年 3 月 26 日(金)  
場 所：京都大学再生医科学研究所

### 開会挨拶

坂口 志文(京都大学再生医科学研究所 所長)

若尾 宏(北海道大学大学院医学研究科助教)  
「霊長類 ES 細胞からの免疫制御性 T リンパ球の分化誘導」

川上 浩一(国立遺伝学研究所教授)  
「脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究」

鄭 雄一(東京大学大学院工学系研究科教授)  
「歯周組織における Scx-Tenomodulin 機能の解明」

浅原 弘嗣(国立成育医療センター研究所部長)  
「腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用」

金澤 卓弥(茨城大学農学部講師)  
「乳腺脂肪細胞の分子細胞生物学的性状解析ならびに脂肪組織未分化細胞の分化誘導系の開発」

久保田 広志(秋田大学工学資源学部准教授)  
「タンパク質品質管理による細胞保護の研究」

白吉 安昭(鳥取大学大学院医学系研究科准教授)  
「ヒト心臓ベースメーカー細胞の樹立と心疾患研究」

岸田 晶夫(東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授)  
「生体スキャフォールドを用いた間葉系組織再生の基礎研究」

島田 義也(放射線医学総合研究所グループリーダー)  
「胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫と Notch1 遺伝子部分欠損の解析」

### 閉会挨拶

開 祐司(京都大学再生医科学研究所 副所長)

## 京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 第 5 回公開講演会 身体と再生 ―細胞から細胞社会へ

開催日：2010 年 7 月 24 日(土)  
場 所：京都大学百周年時計台記念館 1 階百周年記念ホール

### 開会挨拶

「体作りや再生に必要な『はさみ』の話」

再生医科学研究所 瀬原 淳子 教授

「骨のかたちは体に応じて変化する」

再生医科学研究所 安達 泰治 教授

## 6. 共同研究

### 2009 年度共同研究報告(研究期間 2009 年 4 月～2010 年 3 月)

#### 【生体スキャフォールドを用いた間葉系組織再生の基礎研究】

○研究代表者：岸田 晶夫 教授(東京医科歯科大学生体材料工学研究所)

再生医科学研究所共同研究者：岩田 博夫 教授(組織修復材料学分野)

○研究経過及び研究成果：

生体内で生じている間葉系幹細胞の接着・増殖・分化および組織構築能の維持を、生体外で実現するための方法として、脱細胞化骨髄を用いた培養法を検討した。ブタ脱細胞化骨髄へヒト間葉系幹細胞(hMSC)を播種し、造血幹細胞 Niche の再構築について検討した。In vitro の検討では、脱細胞化骨髄に播種された hMSC は内部への生着が観察され、また分化が抑制されていた。これをヌードマウスの皮下に移植し、組織反応および各種因子の遺伝子発現をヒト型プライマーを用いた定量 PCR 反応によって評価した。hMSC 播種骨髄は血管組織が豊富で内部への進入も観察された。一方、mRNA 評価では、骨芽細胞様の発現パターンを示したが、一方で脂肪細胞分化のマーカー分子の発現も観察された。骨髄からの hMSC の分取は非常に困難であった。このように、hMSC 播種脱細胞骨髄による骨髄 Niche の再構築の間接的な現象が観察できた。今後、造血幹細胞の誘導等について検討する予定である。

#### 【ES 細胞由来腎臓系列細胞および血管構成細胞による三次元構造の構築】

○研究代表者：西中村 隆一 教授(熊本大学発生医学研究所)

再生医科学研究所共同研究者：山下 潤 准教授(幹細胞分化制御研究領域)

○研究経過及び研究成果：

ネフロンを構成する間葉由来上皮細胞と血管系細胞との相互作用は腎臓の基本的機能である糸球体濾過や尿管再吸収に不可欠であるばかりでなく、発生過程においても複雑な三次元構造の形成に必須である。そこで本研究は ES 細胞から誘導した腎臓系列細胞と血管内皮細胞との共培養により両者の融合したユニットを構築することを目的とした。腎臓は中間中胚葉から発生すると考えられるため、中間中胚葉で発現する遺伝子座に GFP を挿入した ES 細胞を樹立し、アクチビン、レチノイン酸を添加して培養をおこなったところ、GFP の発現を確認した。しかし GFP 陽性細胞での遺伝子発現が in vivo の中間中胚葉でのそれと完全には重ならないこと、機能的検定であるコロニーアッセイで陽性コロニーが得られないことから、ES 細胞から腎臓系列への誘導を確認するに至っていない。一方共同研究者の山下は、ES 細胞由来 Flk-1 陽性細胞からの血管構成細胞誘導法を確立している。血管は腎臓と異なり側方中胚葉から発生するため、Flk-1 陽性分画からは予想通り腎臓系列遺伝子群の発現はみられなかったものの、この技術は完全に習得した。今後、できるだけ早期に腎臓系列細胞の誘導を成功させ、当初の目的である血管前駆細胞との共培養を行いたい。

#### 【タンパク質品質管理による細胞保護の研究】

○研究代表者：久保田 広志 准教授(秋田大学工学資源学部)

再生医科学研究所共同研究者：永田 和宏 教授(細胞機能調節学分野)

○研究経過及び研究成果：

タンパク質の品質管理機構はタンパク質の変性タンパク質の蓄積や凝集を防ぐことにより、細胞の生存にとって必要不可欠の役割を担っている。筋萎縮性側索硬化症は、タンパク質のフォールディング異常を原因とする神経変成疾患の一つであり、super-oxide dismutase 1(SOD1)の変異体はその原因タンパク質の一つとして知られている。培養細胞内における変異 SOD1 の凝集と脱凝集のダイナミクスを蛍光ライブイメージング等による解析から、変異 SOD1 の凝集や脱凝集は可溶性の小さな集合体(オリゴマー)を介しておこるものと考えられ、脱凝集時にはオリゴマーの出現と共に有意な数の細胞が死ぬことが前年度までの研究でわかった。そこで、遠心分離やフィルタートラップ法などの生化学的方法により凝集体形成の解析を行ったところ、これらの方法で検出される凝集体が現れるタイミングは、蛍光イメージングでオリゴマーが検出されるタイミングとよく似ていた。よって、これらの結果は、脱凝集時に現れるオリゴマーが毒性と関連しているという見方を、生化学的データによって補強したもの

といえる。

#### ○研究成果の公表

Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Noriko Inada, Gen Matsumoto, Richard Morimoto, Masataka Kinjo, Kazuhiro Nagata. Aggregation and disaggregation of ALS-linked mutant SOD1 via soluble oligomers in living cells. 第 61 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム「タンパク質社会と品質管理」(口頭発表)名古屋市 2009.6.3

Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Hideaki Itoh, Masataka Kinjo, and Kazuhiro Nagata. Fluorescently labeled proteins as a tool for analyzing the dynamics of protein quality control in living cells. The Sixth Conference on Materials Engineering for Resources. Keynote session 'New Materials for Life Science-I' (口頭発表)秋田市 2009.10.22

#### 【歯周組織における Scx-Tenomodulin 機能の解明】

○研究代表者：鄭 雄一 教授(東京大学大学院工学系研究科)

再生医科学研究所共同研究者：宿南 知佐 准教授(生体分子設計学分野)

○研究経過及び研究成果：

Tenomodulin(Tnmd)の歯周靱帯における発現を精査した結果、マウス臼歯歯周靱帯では、歯の萌出後で上下臼歯が咬合を開始する時期に Tnmd の発現が検出された。マウス臼歯は生後 2 週から 3 週にかけて口腔内に萌出する。生後 2 週齢マウスでは Tnmd 発現は検出されないが、3 週齢の時期では Tnmd 発現が顕著であった。この時期は、マウスが離乳を開始する時期と一致しており、食物の摂取による咬合力の歯周靱帯への伝達も Tnmd 発現に関与する可能性が示唆された。また、長い細胞突起の伸張が特徴的である象牙芽細胞にも Tnmd 発現が検出されることが明らかになった。

Tnmd の機能的な解析では、*in vitro* での Tnmd 遺伝子導入系と Tnmd ノックアウトマウスの強靱結合組織由来の線維芽細胞を用いた細胞接着試験により、細胞接着の増強に貢献する可能性が示唆された。Tnmd の細胞外ドメイン欠損変異体を用いた解析により、これまでに血管新生抑制作用が知られている C 末端ドメイン以外に、BRICHOS ドメイン及び潜在的酵素切断配列を含む領域(CS 領域)に細胞接着を増強する作用が存在することが明らかになった。

一方、先行研究の結果より、b-HLH 型転写因子の Scleraxis(Scx)が Tnmd 発現を正に制御することが明らかになっている。そこで、開研究室で樹立した Scx-GFP レポーターマウスを用いて口腔組織での Scx 発現を解析した。その結果、歯周靱帯中の線維芽細胞、象牙芽細胞に発現が認められ、Tnmd の発現部位と一致することが確認された。従って、歯周靱帯中の線維芽細胞や象牙芽細胞で発現している Tnmd も、Scx によって制御されている可能性が示唆された。

#### 【DNA 高次構造のクロマチン制御能と中胚葉系細胞の分化制御機構との相関解析】

○研究代表者：大山 隆 教授(早稲田大学教育・総合科学学術院)

再生医科学研究所共同研究者：末盛 博文 准教授(霊長類胚性幹細胞研究領域)

○研究経過及び研究成果：

本研究は、ヒト ES 細胞から中胚葉・内胚葉への細胞系譜への分化を高精度に試験管内で再現できるシステムを用い、DNA 高次構造のクロマチン制御能が未分化細胞からの分化機構にどのように関与しているかを解析するために行った。

我々はこれまでに、クロマチン構造を局所的に規定して転写を活性化できる人工 DNA 断片を各種作製することに成功していた。本研究では、その一つである負の超らせんを擬態した 180 塩基対の DNA 断片(T20)を用いて、そのクロマチン制御能が細胞の分化に関与し得るか否かを解析することにした。しかしながら、レポーターコンストラクトを安定に保持するヒト ES 細胞を研究期間内に得ることができず、当初の目的はまだ達成できていない。この研究は現在も進めている。

一方、同時に進めた研究で興味深い現象を見いだした。それは、マウス ES 細胞に対してクロマチン構造の変化を誘導するような処理を行うと、未分化状態を維持することができず、細胞分化が誘導されるという現象である。今後、クロマチン構造に大きな変化が生じた遺伝子領域を特定すると共に、この細胞分化がその変化に起因する現象かどうかについて検証する予定である。

#### 【ヒト心臓ペースメーカー細胞の樹立と心疾患研究】

○研究代表者：白吉 安昭 准教授(鳥取大学大学院医学系研究科)

再生医科学研究所共同研究者：中辻 憲夫 教授(発生分化研究分野)

○研究経過及び研究成果：

ES細胞から心臓ペースメーカー細胞を樹立し、それらを用いた不整脈などの再生治療を目的に研究を行った。ヒトES細胞から心筋細胞の分化誘導を行い、効率は低いが心筋細胞の分化誘導に成功した。同時に、ペースメーカー細胞を含んだ心筋細胞の分取精製のために、ヒトNkx2.5遺伝子を含んだ改変BACベクター(GFPをNkx2.5のエクソンに挿入したもの)をヒトES細胞に導入し、複数のクローンの分離に成功した。

○研究成果の公表

Morikawa, K., Bahrudin, U., Miake, J., Igawa, O., Kurata, Y., Nakayama, Y., Shirayoshi, Y. and Hisatome I.: Identification, isolation and characterization of HCN4-positive pacemaking cells derived from murine embryonic stem cells during cardiac differentiation. *Pacing Clin Electrophysiol*, in press.

Yasuaki Shirayoshi, Junichiro Miake, Osamu Igawa, Yasutaka Kurata, Jong-Kook Lee, Ichiro Hisatome.

Identification, isolation and characterization of HCN4-positive cardiac pacemaking cells derived from murine EGFP knock-in embryonic stem cells at HCN4 locus 第74回 日本循環器学会総会・学術集会, 京都, 2010

【乳腺脂肪細胞の分子細胞生物学的性状解析および間葉系幹細胞からの分化誘導系の開発】

○研究代表者：金澤 卓弥 講師(茨城大学農学部)

再生医科学研究所共同研究者：戸口田 淳也 教授(組織再生応用分野)

○研究経過及び研究成果：

乳房再建法開発をめざした基礎的研究として、マウスを用いた個体実験および細胞培養法により乳腺脂肪構成細胞の分子細胞生物学的特性について他の脂肪組織、すなわち生殖周囲脂肪組織、褐色脂肪組織および腸間膜脂肪組織と比較解析した。初代乳腺上皮細胞は乳腺以外の脂肪組織内においても増殖および形態形成を行ったが、その程度は乳腺脂肪組織と比較して低いこと、ならびに乳汁合成は乳腺脂肪組織中と同様に行われることを明らかにした。共培養法を用いて初代乳腺上皮細胞と脂肪組織構成細胞の細胞間相互作用を比較した結果、バラクリン様増殖刺激および細胞間親和性ともに乳腺脂肪組織構成細胞との間で最も強く、生殖周囲脂肪組織、褐色脂肪組織および腸間膜脂肪組織それぞれの組織構成細胞との間では比較的弱く、バラクリン因子および細胞間接着分子の差異が示唆された。脂肪組織間で差次的に発現する遺伝子群の網羅的解析によって検出された遺伝子についてさらに詳しく調べることにより、今後、乳腺脂肪幹細胞の特性と分化経路を明らかにしてゆく予定である。

○研究成果の公表

- 1) Kanazawa, T., Sakakura, T. and Toguchida, J. "Comparison of mammary fat pads with other adipose depots for supporting morphogenesis and differentiation of primary mouse mammary epithelial cells *in vivo*". (In preparation)
- 2) 金澤卓弥「マウス各種脂肪組織による乳腺上皮の形態形成および分化支持能力の検証」日本畜産学会第112回大会口頭発表。平成22年3月28日。明治大学。東京。

【胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫とNotch1遺伝子部分欠損の解析】

○研究代表者：島田義也 グループリーダー(放射線医学総合研究所)

再生医科学研究所共同研究者：藤本 真慈 助教(再生免疫学分野)

○研究経過及び研究成果：

X線照射誘発胸腺リンパ腫(X-ray TL)31例と環境化学物質ENU処理誘発胸腺リンパ腫(ENU TL)13例について、リンパ腫のがん遺伝子であるNotch1遺伝子5'欠損の有無を調べた。前者の48%(15/31)、後者の62%(8/13)で、欠損が生じていた。次に欠損部位のDNA塩基配列を解析すると、X-ray TL11例とENU TL4例ではそれぞれ1種類の塩基配列のみ存在していた。ところが、X-ray TL4例とENU TL1例からは2種類の配列、さらにENU TL2例からは3種類、1例からは24種類もの配列を見出した。また複数種類の配列が検出されたTLにおいては、ほぼすべてのTL細胞が持っている配列に一部の細胞のみが持つ配列が加わっていることを明らかにした。つまり、1種類の塩基配列のみ存在していたTLではこの部位での切断、結合、塩基の挿入ががん化の初期に、また、複数の配列が検出されたTLではがん化の過程でそれぞれの細胞で独立におこっていることを示唆している。

続いて、ヒト T リンパ腫の約半数にみられる、二量体形成領域とベスト領域の欠失、挿入を調べた。主に、ベスト領域に変異が集中しており、X-ray TL にはコドン 2361 にホットスポットがあった。以上の結果は、変異の分布は、X-ray TL と ENU-TL で少し異なるものの、Notch1 の変異はマウス胸腺リンパ腫における重要な変化であることが示された。

○研究成果の公表

#### 発表論文

Shizuko Kakinuma, Kazumi Yamauchi, Yoshiko Amasaki, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada: Low-dose radiation attenuates chemical mutagenesis in vivo - Cross adaptation -, Journal of Radiation Research, 50(5), 401-405, 2009

Toshiaki Kokubo, Shizuko Kakinuma, Fumiko Watanabe, Riichirou Iritani\*, Kaori Tateno\*, Mayumi Nishimura, Tetsu Nishikawa, Yoshiya Shimada, et.al: Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model, Cancer Science, 101(3), 616-623, 2010, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01456.x(2010-02-08)

Yu Yamaguchi, Takashi Takabatake, Shizuko Kakinuma, Yoshiko Amasaki, Mayumi Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Kazumi Yamauchi, Yi Shang, Tomoko Miyoshi-Imamura, Hiroyuki Nogawa\*, Yoshiro Kobayashi\*, Yoshiya Shimada: Complicated biallelic inactivation of Pten in radiation-induced mouse thymic lymphomas, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis: A Section of Mutation Research, 686(1/2), 30-38, 2010, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.12.011(2010-01-07)

Tomoko Imamura, Shizuko Kakinuma, Mutsumi Kaminishi, Mieko Okamoto, Takashi Takabatake, Yukiko Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kimiko Murakami-Murofushi\*, Yoshiya Shimada: Unique characteristics of radiation-induced apoptosis in the postnatally developing small intestine and colon of mice, Radiation Research, 173(3), 310-318, 2010

#### 学会発表

Yoshiya Shimada, Mayumi Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Kazumi Yamauchi, Kentaro Ariyoshi, Kazuhiro Daino, Yi Shang, Yoshiko Amasaki, Shinobu Hirano, Shizuko Kakinuma, et.al: Molecular signature in radiation-induced T-cell lymphomas, 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR2009), Seoul, 2009.05

Shinobu Hirano, Shizuko Kakinuma, Yoshiko Amasaki, Norie Kowatari, Kazumi Yamauchi, Mayumi Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Yoshiya Shimada: Comparison of Ikaros, p53 and Kras point mutation in mouse thymic lymphomas induced by simultaneous exposure to X-ray and N-ethyl-N-nitrosourea., 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR2009), Seoul, 2009.05

Yoshiko Amasaki, Shinobu Hirano, Kazumi Yamauchi, Mayumi Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma: Detailed analysis of Ikaros mutation in mouse thymic lymphoma induced by simultaneous exposure of X-rays and N-ethyl-N-nitrosourea, 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR2009), Seoul, 2009.05

Shizuko Kakinuma, Misaki Takimoto, Youtarou Kodama, Yoshiko Amasaki, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada: AGE DEPENDENCY OF LYMPHOMAGENESIS BY RADIATION EXPOSURE IN Mlh1-DEFICIENT MICE, KTCC 2009 International Workshop, 京都, 2009.06

Yi Shang, Shizuko Kakinuma, Yoshiro Kobayashi\*, Yoshiya Shimada: TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF Il9r IN RADIATION-INDUCED MOUSE T-CELL LYMPHOMA CELL LINE, KTCC 2009 International Workshop, 京都, 2009.06

柿沼志津子, 今村智子, 滝本美咲, 高島貴志, 甘崎佳子, 山内一己, 今岡達彦, 西村まゆみ, 室伏きみ子\*, 福士政広\*, 島田義也: Mlh1 欠損マウスに発生する消化管腫瘍と T リンパ腫の被ばく時年齢依存性, 第 24 回発癌病理研究会, 七尾市, 2009.08

Erika Takahashi, Shizuko Kakinuma, Yoshiko Amasaki, Takashi Takabatake, Mayumi Nishimura, Ayumi Kubo, Tatsuhiko Imaoka, Hiroyuki Nogawa\*, Yoshiya Shimada: Genetic changes in heavy-ion-induced T-cell lymphomas in B6C3F1 mice, 第 23 回日本宇宙生物科学会, つくば, 2009.10

Shizuko Kakinuma, Misaki Takimoto, Shinobu Hirano, Akifumi Nakata, Youtarou Kodama, Yoshiko Amasaki, Yi Shang, Mitsuaki Yoshida, Yoshiya Shimada: Age dependence of T-cell lymphoma induction by radiation exposure in B6C3F1 and Mlh1-deficient mice, KIDS workshop 2009 in NIRS - IAEA NIRS Joint Workshop & NIRS Symposium on Radiation Protection

for Children, 千葉, 2009.12

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, SHIMADA Yoshiya: An example of negative selection during thymic lymphomagenesis. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference (2009.6.1-4. 京都)

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, KINA Tatsuo, SHIMADA Yoshiya: Murine thymic lymphomas composed of two subpopulations: undifferentiated cells and differentiated cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (2009.12.2-4. 大阪)

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, KINA Tatsuo, SHIMADA Yoshiya: Analysis of TCR $\beta$  loci in murine thymic lymphomas induced by X-ray irradiation indicates that efficient TCR $\beta$  gene V to DJ rearrangement has occurred. 第32回日本分子生物学会年会 (2009.12.9-12. 横浜)

藤本真慈, 柿沼志津子, 島田義也: 胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫における Notch1 遺伝子部分欠損の解析. 京都大学再生医科学研究所平成 21 年度学術講演会 (2009.12.14. 京都)

#### 【霊長類 ES 細胞からの免疫制御性 T リンパ球の分化誘導】

○研究代表者: 若尾 宏 助教 (北海道大学大学院医学研究科)

再生医科学研究所共同研究者: 坂口 志文 教授 (生体機能調節学分野)

○研究経過及び研究成果:

免疫制御性 T リンパ球の一種である NKT 細胞は個体の免疫増強能ならびに抑制能を有する。従ってこの細胞を大量に産生し、その活性を人工的に制御することができればそれは将来の細胞治療や再生医療に結びつく。既にマウスにおいては核移植技術を用いて末梢 NKT 細胞からクローン胚を作製し、これを T リンパ球へと分化誘導することで、免疫制御能を有する NKT 細胞を大量に産生することが可能となっている。一方、霊長類においては核移植を利用したクローン胚産生は技術的・倫理的な障壁が大きく、実用的ではない。そこで霊長類 NKT 細胞を大量に産生するため、クローン胚産生を用いない代替技術として NKT 細胞特異的な T 細胞抗原受容体を強制発現させた胚性幹細胞を樹立し、それらを T リンパ球へと分化誘導させて NKT 細胞の出現を検討した。その結果、T 細胞特異的な発現を導くプロモーターを使用した場合においても、また普遍的発現を導くプロモーターを使用した場合でも、これら胚性幹細胞を T 細胞に分化させることはできたが、NKT 細胞は観察できなかった。今後は T 細胞抗原受容体の単純な強制発現系構築ではなく、末梢 NKT 細胞のゲノムリプログラミングによる胚性幹細胞の樹立を行って、そこから NKT 細胞分化誘導を行っていく予定である。

#### 【Wnt/ $\beta$ カテニン、及び Bmp シグナル因子群による間葉発生制御とプロテアーゼ因子群の機能解析】

○研究代表者: 山田 源 教授 (熊本大学発生医学研究所)

再生医科学研究所共同研究者: 瀬原 淳子 教授 (再生増殖制御学分野)

○研究経過及び研究成果:

胎児皮膚の形成は上皮と間葉の相互作用という観点で、また細胞増殖因子シグナル系の相互作用の解析という観点で再生医学的に興味ある系である。本共同研究は、Wnt/ $\beta$  カテニンシグナル等を介した皮膚の過形成、病変の形成時に Adam や Mmp 等のプロテアーゼファミリーなどの発現解析を行い、細胞増殖因子系の胎児間葉や器官形成過程における機能を解析するプロジェクトである。胎児皮膚表皮において Wnt/ $\beta$  カテニンを過剰発現すると毛包の運命転換が生じる (Suzuki et. al Development 2009)。この際、皮膚のバリア機能は低下し、更に間葉側(真皮)の発生に対して表皮から相互作用が及ぶ。今回 Mmp2 を含めた真皮における遺伝子の発現の変化がマイクロアレイ解析によって見出された。また真皮においては Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルのアンタゴニストの発現亢進や血管系の形成亢進などが見出された。基底細胞癌等の病態においても、表皮下層にて Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルの亢進を含めたシグナル異常や表皮の過形成について報告がある。一般的に、過形成や細胞増殖が亢進した上皮組織から間葉への分子的影響は、Mmp 等の発現異常を含めて腸管や腺形成に関連した病態としても重要である。今後、上皮の過形成が引き起された時に間葉にどのような分子的变化が引き起されるのか、血管新生の亢進や Mmp ファミリーの発現の異常の意義を含めて継続して解析し、論文としてまとめる予定である。

○研究成果の公表

#### 発表論文

Villacorte M., Suzuki K., Hayashi K., Chuva de Sousa-Lopes S., Haraguchi R., Taketo M. Nakagata M. and Yamada, G.\* Antagonis-

tic crosstalk of Wnt/b-catenin/Bmp signaling within the Apical Ectodermal Ridge (AER) regulates interdigit formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 391 : 1653-1657, 2010

Suzuki,K., Economides,A., Yanagita,M., Graf,D. and Yamada, G.\* New horizons at the caudal embryos: coordinated urogenital/reproductive organ formation by growth factor signaling. *Curr Opin Genet Dev.*, 19 : 491-6, 2009

Miyagawa,S., Moon,A., Haraguchi,R., Inoue,C., Harada,M., Nakahara,C., Suzuki,K., Matsumaru,D., Kaneko,T., Matsuo,I., Yang,L., Taketo,M.M., Iguchi,T., Evans,S.M and Yamada, G.\* Dosage dependent hedgehog signals integrated with 1 Wnt/ $\beta$ -catenin regulate embryonic external genitalia formation as an appendicular program. *Development*, 136 : 3969-3978, 2009

#### 学会発表

Gen Yamada. Regulated Bmp signals are required for caudal embryogenesis; the coordination of our body plan. Session 5: Development I at BMP2009, Berlin, Germany. 2009.9.8

Gen Yamada. Integration of growth factor cascades to regulate organogenesis; Coordinated urogenital/reproductive organ formation. Theme 3: Cell fate determination., the 21st international congress of Biochemistry and Molecular Biology. Shanghai, China. 2009.8.3

#### 【脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究】

○研究代表者：川上 浩一 教授(国立遺伝学研究所)

再生医科学研究所共同研究者：瀬原 淳子 教授(再生増殖制御学分野)

○研究経過及び研究成果：

筋形成および骨格筋と腱の相互作用に関する共同研究を進めている。

川上グループで、トランスポゾン Tol2 を用いて GFP が挿入されたトランスジェニックフィッシュを確立し、その中で骨格筋や腱で発現しているラインを川上グループと瀬原グループで解析している。骨格筋で発現する 1 ラインに関して、筋形成に関わることがわかったことから、ほ乳類でも同様のメカニズムが働いているかどうかを調べるためにマウス筋衛星細胞 C2C12 にこの遺伝子に対する siRNA を導入し、筋形成に対する効果を調べた。現段階では、C2C12 の筋形成には目立った変化はみられていない。一方、腱で発現する 1 ラインに関しては、挿入部位を決定したところ転写因子の上流領域であることが判明し、この転写因子がマウスでも類似的な発現パターンを示すことがわかった。この転写因子の筋形成や腱形成、あるいはこれらの相互作用における役割は不明であることから、引き続きこの遺伝子の役割に関して調べているところである。

○研究成果の公表

Yagita K, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J, Uchiyama Y.(2010) Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 3846-3851.

Takeuchi M, Kaneko H, Nishikawa K, Kawakami K, Yamamoto M, Kobayashi M.(2010) Efficient transient rescue of hematopoietic mutant phenotypes in zebrafish using Tol2-mediated transgenesis. *Dev. Growth Differ.*, 52, 245-250.

Kotani T, Iemura S, Natsume T, Kawakami K, Yamashita M.(2010) Mys Protein Regulates Protein Kinase A Activity by Interacting with Regulatory Type I  $\alpha$  Subunit during Vertebrate Development. *J Biol. Chem.*, 285, 5106-5116.

Yagita K, Yamanaka I, Emoto N, Kawakami K, Shimada S.(2010) Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary cultures of mammalian cells using Tol2 transposon-mediated gene transfer strategy. *BMC Biotechnology.*, 10(1), 3.

Kajita M, Hogan C, Harris AR, Dupre-Crochet S, Itasaki N, Kawakami K, Charras G, Tada M, Fujita Y.(2010) Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *J Cell Sci.*, 123, 171-180.

Appelbaum L, Wang GX, Maro GS, Mori R, Tovin A, Marin W, Yokogawa T, Kawakami K, Smith SJ, Gothilf Y, Mignot E, Mourrain P.(2010) Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 21942-21947.

Sugiyama M, Sakaue-Sawano A, Iimura T, Fukami K, Kitaguchi T, Kawakami K, Okamoto H, Higashijima SI, Miyawaki A.(2009) Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 20812-20817.



- Komisarczuk AZ, Kawakami K, Becker TS.(2009) Cis-regulation and chromosomal rearrangement of the *fgf8* locus after the teleost/tetrapod split. *Dev. Biol.*, 336(2), 301-312.
- Asakawa K, Kawakami K.(2009) The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish. *Methods*, 49(3), 275-281.
- Suster ML, Sumiyama K, Kawakami K.(2009) The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish. *BMC Genomics*, 16; 10, 477.
- Picker A, Cavodeassi F, Machate A, Bernauer S, Hans S, Abe G, Kawakami K, Wilson SW, Brand M.(2009) Dynamic coupling of pattern formation and morphogenesis in the developing vertebrate retina. *PLoS Biol.*, 7(10)e1000214.
- Kim DJ, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Na YR, Park SH, Lee HK, Dutta NK, Kawakami K, Park JH.(2009) Estrogen-responsive transient expression assay using a brain aromatase-based reporter gene in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Med.*, 59(5), 416-423.
- Mejia-Pous C, Viñuelas J, Faure C, Koszela J, Kawakami K, Takahashi Y, Gandrillon O.(2009) A combination of transposable elements and magnetic cell sorting provides a very efficient transgenesis system for chicken primary erythroid progenitors. *BMC Biotechnology*, 18; 9(1), 81.
- Kim DJ, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Na YR, Park SH, Lee HK, Dutta NK, Kawakami K, Park JH.(2009) Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein concentrations in zebrafish embryos. *Toxicol. Mech. Methods*, 19(3), 251-256.
- Koide T, Miyasaka N, Morimoto K, Asakawa K, Urasaki A, Kawakami K, Yoshihara Y.(2009) Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 9884-9889.
- Suster ML, Kikuta H, Urasaki A, Asakawa K, Kawakami K.(2009) Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. *Methods Mol. Biol.*, 561, 41-63.
- Kitaguchi T, Kawakami K, Kawahara A.(2009) Transcriptional regulation of a myeloid-lineage specific gene lysozyme C during zebrafish myelopoiesis. *Mech. Dev.*, 126, 314-323.
- Kim DJ, Seok SH, Baek MW, Lee HY, Na YR, Park SH, Lee HK, Dutta NK, Kawakami K, Park JH.(2009) Benomyl induction of brain aromatase and toxic effects in the zebrafish embryo. *J Appl. Toxicol.*, 29(4), 289-294.
- Urasaki A, Kawakami K.(2009) Analysis of genes and genome by the tol2-mediated gene and enhancer trap methods. *Methods Mol. Biol.*, 546, 85-102.
- Kikuta H, Kawakami K.(2009) Transient and stable transgenesis using tol2 transposon vectors. *Methods Mol. Biol.*, 546, 69-84.
- Esaki M, Hoshijima K, Nakamura N, Munakata K, Tanaka M, Ookata K, Asakawa K, Kawakami K, Wang W, Weinberg ES, Hirose S.(2009) Transient and stable transgenesis using tol2 transposon vectors. *Dev. Biol.*, 329, 116-129.
- 浦崎明宏, 浅川和秀, 川上浩一(2009) メダカトランスポゾン Tol2 が開く新しいゼブラフィッシュ研究, *細胞工学*, 28, 586-591.
- 学会発表**
- Kawakami, K.. From gene to function: a quest with a transposon. zebrafish 2010: 11th Australia & New Zealand Workshop. 2010.2.3-5, Sydney, Australia.
- Kawakami, K.. Genetic methods using the Tol2 transposable element in zebrafish. International Symposium on Marine Genomics 2009. 2009.12.15-18, 那覇市
- Asakawa, K., et al. Role of the hindbrain in embryonic motility and location. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
- Morita, R., et al. Jagged-Notch signaling regulates patterning activity and structural role of the Notochord through control of cell differentiation. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
- Yano, T., et al. Mechanism of pectoral fin development in zebrafish using //prx1// limb-specific enhancer activity. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
- Tanino, S., et al. Gene trap revealed a role of Sox5 in the morphogenesis of the semicircular canal. 第 32 回日本分子生物学会年会,

- 2009.12.9-12, 横浜市
- Takeuchi, M., An easy and effective approach to rescue zebrafish mutant phenotypes via transient transgenesis using Tol2 constructs. 第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
- Agetsuma, M., et al. Genetic inactivation of the habenulo-interpeduncular projection enhances the conditioned fear response in zebrafish. 第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
- Yoshida, J., et al. Insertional mutagenesis of the mouse ES cell genome with the Tol2 transposon. 第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜市
- 川上浩一. 光るゼブラフィッシュリソース, NBRP シンポジウム「NBRP が提供するミュータントリソース」, 2009.12.9, 横浜市
- 浦崎明宏, 他. Tol2 を用いたゼブラフィッシュ遺伝子の網羅的破壊, 日本遺伝学会第81回大会, 2009.9.16-18, 松本市
- 揚妻正和, 他. 手綱核・脚間核路の遺伝学的破壊はゼブラフィッシュの恐怖反応を昂進させる, 第32回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
- 武藤彩, 他. カルシウムイメージング法を用いたゼブラフィッシュ機能的神経回路の可視化, 第32回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
- 小出哲也, 他. アミノ酸への誘因行動を司るゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析, 第32回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
- 吉田綾子, 他. 子宮内穿孔法と Tol2 トランスポゾンシステムを用いてグリア細胞特異的に遺伝子を発現させる方法の開発, 第32回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
- 喜多善亮, 他. 小脳を構成するニューロンとグリアの発生-子宮内電気穿孔法を用いた網羅的解析-, 第32回日本神経科学大会, 2009.9.16-18, 名古屋市
- 武藤彩, 他. ゼブラフィッシュ運動系における機能的神経回路の可視化, 第15回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
- 浅川和秀, 他. 触覚刺激に対する逃避行動の発達における後脳の役割, 第15回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
- 小出哲也, 他. アミノ酸への誘因行動を介在するゼブラフィッシュ嗅覚神経回路の遺伝学的解析, 第15回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
- 竹内未紀, 他. Tol2 システムを利用した一過性レスキュー解析, 第15回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
- 阿部玄武, 他. IRES を用いた Tol2 トランスポゾンによる遺伝子トラップ法の開発, 第15回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
- 池永隆徳, 他. ゼブラフィッシュ脊髄での pax8 遺伝子の発現パターンと回路形成における役割, 第15回小型魚類研究会, 2009.9.12-13, 名古屋市
- Suster, M.L., et al. Botulinum Neurotoxin transgenic zebrafish for dissecting neuronal circuits in vivo and creating novel variants for neurotherapeutics. 46th Congress of the European Societies of Toxicology, 2009.9.13-16, Dresden, Germany.
- 矢野十織, 他. Apical fold morphogenesis in zebrafish fin; differences from tetrapod limb development. 16th International Society of Developmental Biologists Congress, 2009.9.9-10, Edinburgh, Scotland.
- Okamoto, H., et al. Functional analysis of the habenula in control of fear. The 4th Asia-Oceania Zebrafish Meeting, 2009.8.31-9.2, Jeju, Korea.
- Kawakami, K. Transposon-mediated gene trapping, enhancer trapping and insertional mutagenesis. The 4th Asia-Oceania Zebrafish Meeting, 2009.8.31-9.2, Jeju, Korea.
- 川上浩一. 生命の不思議を解き明かす光るゼブラフィッシュ, ゲノムひろば2009 in アキバ・ゲノム研究勢ぞろい, 2009.8.1-2, 東京都
- Agetsuma, M., et al. Functional analysis of the habenula in control of fear. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
- Han, H.W., et al. Transgenic zebrafish Tg(Nogo-B:GFP) line recapitulates the Nogo-B expression pattern in diverse tissues including the liver and intestine. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
- Appelbaum, L., et al. Hypocretin interacts with melatonin in regulating sleep in zebrafish. 6th European Zebrafish Genetics and

- Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
- Cheng, C. H., et al. A novel zebrafish cyclin dx gene : expression profile, requirement for the development of primordium motor neuron, pmn and characterization of its promoter region. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
- Ono, F., et al. Formation of spinal network dependent on domain-specific Pax genes. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
- Urasaki, A., et al. The gene trap approach reveals involvement of mekk3b in the functional blood vessel formation. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
- Santoriello, C., et al. Expression of H-RASV12 in a zebrafish model of Costello syndrome causes cellular senescence in adult proliferating cells. 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 2009.7.15-19, Rome, Italy.
- Kawakami, K. Tol2-mediated transgenesis in zebrafish and mice. Conference on Genome Engineering, 2009.6.25-27, Minneapolis, USA.
- 矢野十織, 他. ゼブラフィッシュ胸鰭末端上皮の形態形成. 第6回 東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2009.6.16, 仙台市
- 川上浩一, zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. データベースが拓くこれからのライフサイエンス, 2009.6.12, 東京都
- Abe, G. et al. The zebrafish cdc73 is essential for embryogenesis and expression of fgf24 in pectoral fin development. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009.5.28-31, 新潟市
- Lal, P. et al. Characterization of gene trap and enhancer trap transgenic zebrafish lines that express Gal4 in specific region of brain in adult stage. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009.5.28-31, 新潟市
- Yano, T., et al. Apical fold morphogenesis of pectoral fin in zebrafish. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009.5.28-31, 新潟市
- Yoshida, A., et al. An effective and convenient method to express transgene by the combination of in utero electroporation and the Tol2 transposon system ; inducible or cell-type specific expression in glia. 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2009.5.28-31, 新潟市
- Agetsuma, M., et al. Genetic inactivation of the asymmetric habenulo-interpeduncular projection enhances the conditioned fear response in zebrafish. The 2009 meeting on Synapses : from molecules to circuits & behavior, Cold Spring Harbor Laboratory, 2009.4.14-18, New York, USA.

#### 【腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用】

○研究代表者：浅原 弘嗣 部長(国立成育医療研究センター研究所)

再生医学研究所共同研究者：戸口田 淳也 教授(組織再生応用分野)

○研究経過及び研究成果：

腱および軟骨の発生・分化に関与する遺伝子を同定するために、約1,600の転写制御因子の Whole mount in situ hybridization (WISH)データベース“EMBRYS”を構築した(Yokoyama et al., 2009)。その結果、四肢で特徴的な発現をしている複数の因子を同定した。また、ヒト軟骨細胞の網羅的な遺伝子プロファイリングを行い、軟骨細胞で発現の高い遺伝子を同定した。これらの機能解析や、因子間のネットワークを解析し、腱や軟骨などの発生メカニズムの解明を目指した。

ヒト軟骨細胞の網羅的な遺伝子プロファイルにて得られた遺伝子の中で、ヒト間葉系幹細胞に比べ発現が高いmiRNAを同定し、Real Time PCRにて同様にヒト軟骨細胞で発現が高いことを観察した。このmiRNAは霊長類でのみ同定されており、戸口田研究室との共同研究にて、ヒト間葉系幹細胞を用いた軟骨分化モデルで発現の増減を解析し、強制発現、発現抑制の実験にてこのmiRNAの軟骨分化への影響を調べることを計画し、現在検討中である。

WISHデータベースより腱に発現する転写因子としてホメオボックス遺伝子であるMohawk(Mkx)が同定された。この遺伝子のノックアウトマウスを作製・解析した結果、腱の低形成が観察され、Mkxが腱分化に重要な転写因子であることを示した(Ito et al., in revision)。さらにこの転写因子の腱発生・再生における機能について解析するために、開研究室と共同研究にて腱

組織で過剰発現するように遺伝子を改変したマウスを作製する計画をたて、現在作製中である。

○研究成果の公表

Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H.

The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (in revision).

Yokoyama S, Ito Y, Ueno-Kudoh H, Shimizu H, Uchibe K, Albin S, Mitsuoka K, Miyaki S, Kiso M, Nagai A, Hikata T, Osada T,

Fukuda N, Yamashita S, Harada D, Mezzano V, Kasai M, Puri PL, Hayashizaki Y, Okado H, Hashimoto M, Asahara H. A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. *Dev Cell*. 2009; 17(6) : 836-848.

2010 年度共同研究課題一覧

○短期研究課題

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題
小林 尚俊 グループリーダー (独)物質・材料研究機構生体材料センター)	田畑 泰彦 教授 (生体材料学分野)	3次元ナノファイバー足場内における幹細胞分化に関する研究
柿沼 志津子 チームリーダー (独)放射線医学総合研究所)	藤本 真慈 助教 (再生免疫学分野)	マウス胸腺リンパ腫細胞における未分化状態の維持と分化に関するニッチの因子
國府 力 特任准教授 (大阪大学先端科学イノベーションセンター)	宿南 知佐 准教授 (生体分子設計学分野)	骨格組織構築に関与する幹細胞群の移動と局在
鳥光 慶一 主任研究員 (NTT 物性科学基礎研究所 (生体物性学分野客員教授))	岩田 博夫 教授 加藤 功一 准教授 (組織修復材料学分野)	マシンプレインインターフェースを活用した神経ネットワークの構築
高木 淳一 教授 (大阪大学蛋白質研究所)	瀬原 淳子 教授 (再生増殖制御学分野)	幹細胞-ニッチ間相互作用とその制御の分子メカニズムの構造生物学的解明
平澤 恵理 先任准教授 (順天堂大学大学院医学研究科)	長澤 丘司 教授 尾松 芳樹 博士研究員 (生体システム制御学分野)	細胞外マトリックス分子、パルカンの幹細胞ニッチとしての生物学的意義の解明

○長期研究課題(2010 年度～2012 年度)

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題
山本 照子 教授 (東北大学大学院歯学研究科)	開 祐司 教授 宿南 知佐 准教授 杉本 由紀 院 生 (生体分子設計学分野)	矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析
森田 隆 教授 (大阪市立大学大学院医学研究科)	近藤 玄 准教授 (再生実験動物施設)	精原細胞のニッチとしてのセルトリ細胞の遺伝子発現解析

○長期研究課題(2009 年度～2011 年度)

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題
川上 浩一 教授 (国立遺伝学研究所)	瀬原 淳子 教授 (再生増殖制御学分野)	脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究
浅原 弘嗣 部長 (国立成育医療研究センター)	戸口田 淳也 教授 (組織再生応用分野)	腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用

## 7. 協議員・教職員・その他構成員名簿

(平成23年1月1日現在)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所協議員(所外) ◆

小 西 郁 生 (京都大学大学院医学研究科教授)  
長 田 重 一 (京都大学大学院医学研究科教授)  
伊 藤 紳三郎 (京都大学大学院工学研究科教授)  
北 村 隆 行 (京都大学大学院工学研究科教授)  
西 田 栄 介 (京都大学大学院生命科学研究科教授)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所運営委員(所外) ◆

大 隅 典 子 (東北大学大学院医学系研究科教授)  
妙 中 義 之 (国立循環器病センター研究所副所長)  
高 戸 毅 (東京大学大学院医学系研究科教授)  
長 田 重 一 (京都大学大学院医学研究科教授)  
西 川 伸 一 (理化学研究所発生・再生科学総合研究センター副センター長)  
西 田 幸 二 (大阪大学大学院医学系研究科教授)  
月 田 早智子 (大阪大学大学院生命機能研究科教授)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所教職員等 ◆

所長(兼): 坂 口 志 文    副所長(兼): 開 祐 司, 岩 田 博 夫

### ■ 生体機能学研究部門 ■

#### 〈細胞機能調節学分野〉

准教授: 細川暢子    事務補佐員: 児玉菜恵  
大学院生: 藤森 力

#### 〈生体微細構造学分野〉

講師: 平芳一法    研修員: 法邑賢一

#### 〈生体機能調節学分野〉

教授: 坂口志文    助教: 山口智之    講師(非常勤): 坂口教子, 大倉永也  
特任事務職員: 高山みな    事務補佐員: 小長谷菜美    教務補佐員: 柴田 茜, 松浦真由美    技術補佐員: 岡本陽己  
特任研究員: 橋本 求, 濱口真英, 村瀬藤生  
研究員(科学研究): 佐々木直人, 伊藤能永, 田中 淳, 飯尾健一郎, Nicholas Crabb  
大学院生: 瀬藤和也, 大崎一直, 藤森千尋, 秋月修治, 森川洋匡, 坂井 薫, 島津 裕

#### 〈生体システム制御学分野〉

教授: 長澤丘司    助教: 杉山立樹    研究員(学術支援): 尾松芳樹    事務補佐員: 坂田 彩  
特定研究員(G-COE): ^中川俊徳  
大学院生: 長岡 真, 川口晃司, 金成香奈子

〈生体再建学分野（国内客員）〉

（欠員中）

■ 生体組織工学研究部門 ■

〈生体分子設計学分野〉

教授：開 祐司 准教授：宿南知佐 講師（非常勤）：近藤 淳，鄭 雄一，小守壽文，池川志郎

教務補佐員：滝本 晶 技術補佐員：杉山弘美 大学院生：毛利公美，佐野寛子，島村仁子，赤路佐希子

特定研究員（学術支援）：三浦重徳 研究員（G-COE）：杉本由紀 研究生：郭 龍

〈生体材料学分野〉

教授：田畑泰彦 助教：山本雅哉 講師（非常勤）：原島秀吉，中村雅也，金田安史

事務補佐員：岩根由依 技術補佐員：吉田久子 教務補佐員：森田美枝

大学院生：高木智紹，齊藤高志，根来宏光，河井可奈江，岡本竜弥，平井健次郎，郡司周太郎，隅田 仁，中村陽子，古谷洋之，白井智明，戸田裕之，田島脩平，石川英史，糸岡朝樹，稲生佳菜子 学部生：佐藤圭祐，永榮蓉子，馬 一丹，吉川 宗

受託研究員：渡邊耕平，福西賢晃，杣本 聡，豊島永実子 研究員（産官学連携）：上杉佳子 研究員（産官学連携）：松井 誠

特定研究員（G-COE）：△小原洋志 民間等共同研究員：園田 浩

日本学術振興会外国人特別研究員：Juthamas Ratanavaraporn 特別研究学生：宮澤敦子

〈組織修復材料学分野〉

教授：岩田博夫 准教授：加藤功一 講師（非常勤）：宇山良公

事務補佐員：鈴木義子 教務補佐員：寺川公美子

大学院生：陳 顯，Nguyen Minh Luan，EGAWA Edgar Yuji，小長谷周平，小村 嵩，竹本直紘，村上隆史，櫻井研吾，

古田雅典，前田 晋 特定研究員（学術支援）：有馬祐介 研究員（研究機関）：河野恵子

研究員（産官学連携）：戸田満秋，児玉智信 受託研究員：藤田 聡

〈生体物性学分野（国内客員）〉

教授：鳥光慶一

■ 再生統御学研究部門 ■

〈発生分化研究分野〉

教授：中辻憲夫 助教：中馬新一郎 研究員（科学研究）：\*細川美穂子

教務補佐員：森部江美子 技術補佐員：田中ます子 事務補佐員：酒井睦美，廣富ひとみ

大学院生：熊谷英明

〈再生誘導研究分野〉

（欠員中）

〈再生増殖制御学分野〉

教授：瀬原淳子 助教：栗崎知浩 特定研究員（G-COE）：△飯田敦夫

特定研究員（科学研究）：栗崎智美 特定研究員（学術支援）：佐藤文規 事務補佐員：倉澤祥子

技術補佐員：黒田信子 研究員（iPS 研究）：佐藤貴彦

大学院生：木村剛隆，坂口和弥，酒井大史，西邨大吾，平向洋介，荒井宏行，岩木 彩，庄子栄美，谷米竜馬

〈再生免疫学分野〉

准教授：喜納辰夫 助教：藤本真慈

■ 再生医学応用研究部門 ■

〈生体修復応用分野〉

准教授：高橋 淳 特定研究員（産官学連携）：西村周泰 特定研究員（最先端研究）：◇森實飛鳥，◇土井大輔

事務補佐員：五味淵淑子 技術補佐員：窪田 慶，勝川美都子，◇元野 誠，◇山崎絵海

大学院生：菊地哲広，五味正憲，鷺田和夫，北村彰浩，吉川達也，小倉 綾，佐俣文平

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 講師：加藤友久 特定研究員(学術支援)：池谷 真 研究員(研究機関)金 永輝

事務補佐員：安田尚代，芳野麻里絵 技術補佐員：小林由紀子，永田早苗，平賀理香

大学院生：那須 輝，早川和男，玉置さくら，Elalaf Hassan，小林恭介，松本佳久，横山宏司，澤野貴之

〈器官形成応用分野〉

准教授：角 昭一郎 特定助教(産官学連携)：白水泰昌 講師(非常勤)：砂村真琴，日裏彰人，小川知彦

事務補佐員：菊地裕子 外国人共同研究者：楊 凱強 研究生：星野順一 研修員：柳井伍一

〈臓器再建応用分野〉

准教授：中村達雄 講師(非常勤)：早川克己，稲田有史，堀 義生，茂野啓示，萩原明於

事務補佐員：矢延聡枝 技術補佐員：石田久恵 大学院生：小林丈士，島田英徳，木田直樹，本多通孝，小島史嗣

研究生：町口敏彦，畑山敬秀，瀬川篤典，山本一道，宇治正人

研修員：井上祐利，中田 顕，楯川幸弘 特別研究学生：西澤祐史

〈再生医学応用流動分野〉

(欠員中)

■ 附属再生実験動物施設 ■

施設長(兼)：長澤丘司 副施設長(兼)：戸口田淳也 准教授：近藤 玄 技術職員：出口央士，松尾美奈

技能補佐員：古卿智英，人見博子，石丸英典，西山尚之，柴田 豊，森本幸子，田中正行，藤田 章，竹明フサ，向 一哲，

後藤 円，森 栄一，佐々木 勉 技術補佐員：折橋 郁，大川実穂 教務補佐員：渡邊仁美

■ 附属幹細胞医学研究センター ■

センター長(兼)：中辻憲夫

〈霊長類胚性幹細胞研究領域〉

准教授：末盛博文 特定研究員(NBRP)：宮崎隆道

特定研究員(産官学連携)：山内香織 教務補佐員：采女久実子，後藤律子 大学院生：武内大輝

〈幹細胞分化制御研究領域〉

准教授：山下 潤 研究員(iPS細胞研究)：◇武田匡史 日本学術振興会特別研究員：山水康平

大学院生：檜崎元太，魚崎英毅，松永太一，福島弘之，熊本博美

教務補佐員：村山千里，志野瑞穂，片山志織 研究生：劉 娅婧 研修員：星野託広

〈幹細胞加工研究領域〉

准教授：多田 高 特定研究員(産官学連携)：山口新平 外国人共同研究者：程 李涛

研究員(産官学連携)：福地恵美

大学院生：平野邦生，長田翔伍

〈細胞プロセッシング研究領域(客員)〉

教授：高橋恒夫 准教授：古江－楠田美保 特定講師(特別教育研究)：川瀬栄八郎

特定研究員(特別教育研究)(CPC主任)：高田 圭 特定研究員(特別教育研究)：尾辻智美 技術補佐員：濱生麻里

〈再プログラム化研究領域(客員)〉

(欠員中)

■ 附属ナノ再生医工学研究センター ■

センター長(兼)：楠見明弘

〈ナノバイオプロセス研究領域〉

教授：楠見明弘 特任講師：\*藤原敬宏 特定研究員(WPI)：\*謝 敏, \*幸重美津子

大学院生：根本悠宇里, 柴田明裕, Sven Rasidi, 工藤恭彦, 後神秀考, 白居祐希, 池田泰祐, 角山貴昭, 吉田謙太, 塚本美久, 陳 莉敏

民間等共同研究員：\*鈴木健一, \*中田千枝子, \*Rahul Chadda, \*渋谷周作

教務補佐員：\*坪井久恵, \*土方博子, \*入谷真由子, \*廣瀬幸一郎, \*Ankita Chadda 技術補佐員：\*宮原愛美

〈シミュレーション医工学研究領域〉

准教授：玄 丞然 講師(非常勤)：南部敏之, 茂木伸夫, 中島直喜 特任助教：松村和明

事務補佐員：小柴里美 技術補佐員：李 浚載

大学院生：加藤希理子, 竹内敦史

特定研究員(産官学連携)：東 高志 研究員(研究機関)：中井隆介

〈ナノバイオメカニズム研究領域〉

助教：都賀谷紀宏

〈バイオメカニクス研究領域〉

教授：安達泰治

民間等共同研究員：山岡英孝, 須長純子, 韓 成雄, 三好洋美

大学院生：亀尾佳貴, 松下慎二, 奥田 覚, 長崎益三, 村田勝章, 石橋弘輝,

学部生：石橋和樹, 佐邊稜太郎, 鈴木健介

〈再生医工学研究領域 (外国人客員)〉

(欠員中)

■ 技術部 ■

技術専門員：松下隆壽 再雇用職員：小岸久美子

■ 事務部 ■

事務長：森 勝二

専門職員(総務担当)：旗谷文一 主任：服部和枝 事務補佐員：戸倉理恵子

専門職員(財務担当)：馬場 勉 主任：金子恵子 事務補佐員：緒方康子

※：物質－細胞統合システム拠点所属 ◇：iPS細胞研究所所属

△：医学研究科所属



---

---

*Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences*  
*Kyoto University 2010*

京都大学再生医科学研究所年報 2010

2011 年 4 月 19 日 印刷 2011 年 4 月 26 日発行

発 行 京都大学再生医科学研究所

京都市左京区聖護院川原町53 〒606-8507

印 刷 ㈱北斗プリント社

---

---

